



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**Expresión de genes involucrados en la
síntesis de carotenoides en el fruto de
tomate por la aplicación de
oligogalacturónidos y ethephon**

Por:

Q.B. Claudia Vanessa García Baldenegro

**Tesis aprobada por:
La Coordinación de Tecnología de Alimentos de
Origen Vegetal**

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

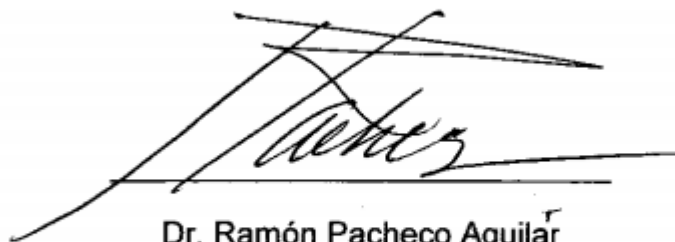
Enero de 2011

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos deberá contar con la autorización del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.

ATENTAMENTE

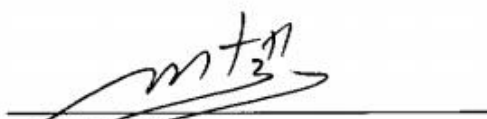
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Pacheco', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat abstract.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar^r

Director General

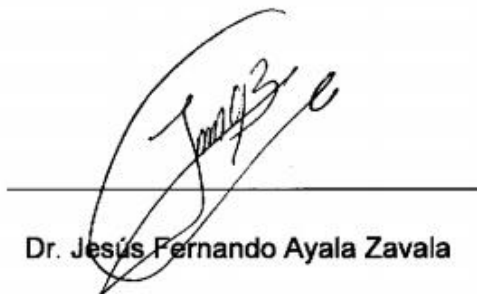
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Claudia Vanessa García Baldenegro, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



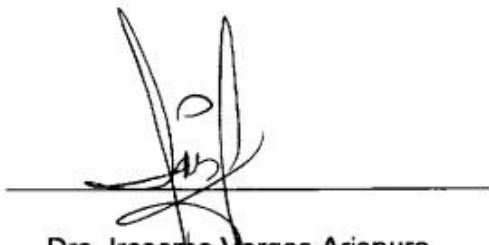
Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez

Director de tesis



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala

Asesor



Dra. Irasema Vargas Arispuro

Asesor



Dra. Gloria Yepiz Plascencia

Asesor

DEDICATORIA

A Dios, por el privilegio de prestarme vida y guiarme en el camino personal y profesional. Sigo en tus manos.

A mis Padres, Jesús Alfredo García y María de Jesús Baldenegro, a quienes debo lo que soy y a quienes dedicó mis éxitos.

A mis hermanos Karla y Alfredo, por compartir tantos años de aventuras, risas y sinsabores, gracias por estar a mi lado, la vida no tendría el mismo sentido sin ustedes.

A mi sobrina, Aleika, quien me ha traído tantas dulces sorpresas.

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han contribuido directa e indirectamente con la realización de esta tesis. Agradezco mucho su apoyo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por aceptarme y brindarme la oportunidad de realizar mis estudios en el programa de maestría en ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero brindado durante la realización de este proyecto.

A mi Director de Tesis, Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez por aceptarme como estudiante y confiar en mí para llevarlo a término, por ser un guía y brindar la seguridad de un apoyo moral y académico, así como por ser un ejemplo a seguir.

A mi Comité de Tesis, los Doctores Irasema Vargas, Gloria Yépiz y Fernando Ayala, agradezco su apoyo, dedicación y atención brindada.

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) por sus palabras de aliento y las opiniones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Fisiología Vegetal (LFV) integrado por el Q.B Francisco Soto (Panchito) por su apoyo técnico y moral, así como por sus palabras de aliento y su amistad. A la M.C. Adriana Contreras Valenzuela ("la Adri"), quien me brindó su apoyo técnico durante la estandarización de técnicas y me brindó una sincera amistad. Gracias por los momentos que pasamos juntas, las salidas (al London y la Cueva), las pláticas que tuvimos, las risas y demás momentos inolvidables y entrañables. Al M.C. Emmanuel Aispuro por su apoyo en los muestreos, técnicas moleculares y compartir sus conocimientos, así como por su amistad y muchos ratos agradables. A la M.C. Marisol Ochoa, quien me brindó apoyo técnico y me brindó su amistad cuando aún era estudiante de maestría. A la Q.B. Olivia Briceño, quien a través de la coordinación sigue apoyándonos con su

conocimiento, y nos saca una sonrisa con sus bromas y ocurrencias. Agradezco haberme topado con un grupo de trabajo tan llevadero y alegre.

Así mismo, agradezco a la Q.B. Socorro Vallejo por su apoyo en la extracción de carotenos, así como por sus palabras tan agradables; a la M.C. Consuelo Corrales por su apoyo en la cuantificación de carotenoides, por su confianza dentro y fuera del laboratorio y su amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Blanquita, Enrique, Abel, Gabriel Iván y Manuel. Blanquita, una chispa que brinda mucha luz, gracias por tus palabras y por tus ocurrencias, me encantó ser tu compañera de generación y de laboratorio, no pude pedir a alguien mejor. A Enrique Enriquez cuya amistad venía de años atrás y quien por haberlo reencontrado me llevó a este momento culminante. Gracias por tu gran amistad, tus palabras de aliento, por seguir confiando en mí y por dejarme tantas enseñanzas. A Abelito, quien siempre con una sonrisa y su palabra 'éxito' me exhorta a seguir adelante. A Gabriel, quien en este año me ofreció su amistad y compartimos muchos momentos agradables dentro y fuera del laboratorio. A "Manny", son pocos meses compartidos pero amenos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. A Irlanda, Azucena y Erika que son como parte del laboratorio de Fisiología Vegetal.

Agradezco también al I.Q. Jorge Jiménez y al Q.B. Carlos Valenzuela, por su apoyo en el laboratorio. ¡Jamás olvidaré la bienvenida de Jorge!

También quiero agradecer al M.C. Jorge Mercado, por su apoyo técnico y préstamo de equipo.

De manera especial, agradezco a los Dres. María Islas, Gustavo González, Martín Tiznado, Rosalba Troncoso, Agustín Rascón, a la M.C. Armida Rodríguez, al M.C. Alberto Sánchez y al M.C. Javier Ojeda. Por sus palabras de aliento y conocimiento compartido.

Agradezco de sobremanera a mis compañeros de maestría. Me encantó estar en un lugar con intercambio de culturas, maneras de pensar, con personas tan

agradables en su trato. Me quedo con el recuerdo de nuestras convivencias, los martirios, nervios, momentos de estudios juntos así como las reuniones y salidas. A mis muchachos Alex, José, Jorge, Chava... extraño tomarnos unas heladitas juntos. ¡¡Blanquita, Gaby, Linda, Bertha, Erika vamos al London!!

Y un agradecimiento especial para Magda Pacheco (Magdita) y Tania Fragoso, que a pesar de no ser del laboratorio, pasamos muchos tiempos juntas en ellos. Gracias por las pláticas y momentos personales compartidos, sobretodo, por su amistad.

A mis amigas, las Fernanda Gastelum, Fernanda Machado y Dalia, por su amistad a través de todos estos años, y a Nidia, quien a pesar de tan reciente amistad, ha sido un gran apoyo.

Le doy gracias a mis padres, por creer en mí, por todo su apoyo moral y económico, su amor incondicional, por estar siempre presentes y pendientes de mis necesidades. A mi familia, por siempre tener sus brazos abiertos y soportar mis “momentos de estrés”. Y a mis tíos que siempre están ahí y me exhortan a continuar. A mi nana Coyo, quien siempre fue un gran ejemplo a seguir, una gran mujer dulce y alegre, luchadora e incansable.

Y por último, con la esperanza de no olvidar a nadie, agradezco a Dios, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE CUADROS	xii
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
El Color como Índice de Calidad.....	2
Formación de Color en Tomate.....	4
Carotenoides: características y función.....	4
Biosíntesis de carotenoides. Genes relacionados con la síntesis de carotenoides.....	5
Factores que Influyen en la Coloración del Tomate.....	8
Luz y Temperatura.....	9
Etileno.....	10
Compuestos químicos.....	12
Regulación de Síntesis de Etileno en Frutos Climáticos.....	14
Oligogalacturónidos: su Origen y su Función.....	17
Oligogalacturónidos y su Relación con Etileno.....	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Preparación de Oligogalacturónidos.....	21
Material Vegetal.....	21
Discos como modelo de estudio.....	21
Preparación de discos de pericarpio de tomate.....	22
Diseño de Experimentos.....	22
Aplicación de Tratamientos.....	23

Análisis Fisiológicos.....	23
Determinación de la producción de Etileno y CO ₂	23
Color.....	24
Cuantificación de Licopeno, β-Caroteno y Luteína.....	25
Estudio Molecular.....	26
Extracción de ARN Total.....	26
Síntesis de ADN Complementario (ADNc).....	26
Diseño de Oligonucleótidos Específicos.....	27
Amplificación de <i>LePSY</i> y <i>LeZDS</i>	27
Análisis de los Datos.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
Obtención de la Mezcla de Oligogalacturónidos.....	29
Velocidad de respiración.....	31
Producción de etileno.....	35
Color.....	39
Cuantificación de Licopeno, β-Caroteno y Luteína en pericarpio de discos de tomate bola ‘Grandella’.....	46
Estudio Molecular.....	50
Evaluación de la Expresión de Genes de la Biosíntesis de Carotenoides en Discos de Pericarpio de Tomate Bola ‘Grandella’.....	50
Expresión de <i>LePSY</i>	50
Expresión de <i>LeZDS</i>	53
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vía metabólica para la biosíntesis de carotenos.....	6
2	Biosíntesis de etileno.....	16
3	Mezcla de oligogalacturónidos de 3-20 grados de polimerización (GP).....	30
4	Producción de etileno ($\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$) en discos de pericarpio de tomate de la variedad 'Grandella' a 25 °C, 8 días después de la aplicación de AVG 10 mM, OGA 5.0 g/L; AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L; Ethepon 2 mL/L y AVG 10 mM + Ethepon 2 mL/L.....	38
5	Cambios de color (a^*/b^*) en discos de pericarpio de tomate bola de la variedad 'Grandella' a 25 °C, 4 días después de la aplicación de AVG 10 mM, OGA 5.0 g/L; AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L; Ethepon 2 mL/L y AVG 10 mM + Ethepon 2 mL/L.....	44
6	Cambios de color (a^*/b^*) en discos de pericarpio de tomate bola de la variedad 'Grandella' a 25 °C, 8 días después de la aplicación de AVG 10 mM, OGA 5.0 g/L; AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L; Ethepon 2 mL/L y AVG 10 mM + Ethepon 2 mL/L.....	45

7	Niveles de expresión del transcrito <i>LeZDS</i> en discos de pericarpio de tomate bola de la variedad 'Grandella' a 25 °C, 4 días después de la aplicación de AVG 10 mM, OGA 5.0 g/L; AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L; Ethephon 2 mL/L y AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L.....	56
---	--	----

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación estándar de la USDA de acuerdo al grado de madurez y color.....	3
2	Características de los oligonucleótidos diseñados.....	27
3	Tasa respiratoria (mL/kg•h de CO ₂ a 25 °C) en discos de pericarpio de tomate bola de la variedad 'Grandella' en estado verde maduro, por efecto de una mezcla de OGAs de 3-20 GP y Ethephon.....	34
4	Producción de etileno (µL/kg•h) en discos de frutos de tomate bola de la variedad 'Grandella' durante la maduración de los discos del fruto a partir del estado verde maduro, por efecto de una mezcla de OGAs de 3-20 GP, Ethephon, y su combinación.....	36
5	Evolución en el color en relación al valor a*/b* en discos de pericarpio de tomate bola cv. 'Grandella' al aplicar dos mezclas de OGA a 5.0 g/L y 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L, Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L.....	41

6	Evolución en el color en relación al valor a*/b* en discos de pericarpio de tomate bola cv. 'Grandella' al aplicar AVG 10 mM, y combinaciones de AVG 10 mM+ Ethephon 2 mL/L, AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L.....	42
7	Acumulación de licopeno, β -caroteno y luteína en discos de pericarpio de tomate bola cv. 'Grandella' al aplicar mezclas de OGA a 5.0 g/L y 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L, Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L.....	48
8	Acumulación de licopeno, β -caroteno y luteína en discos de pericarpio de tomate bola cv. 'Grandella' al aplicar AVG 10 mM, y combinaciones de AVG 10 mM+ Ethephon 2 mL/L, AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L.....	49
9	Niveles de expresión del ARNm de <i>LePSY</i> , obtenidos de discos de pericarpio de tomate bola 'Grandella' al aplicar dos mezclas de OGA a 5.0 g/L y 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L, Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L.....	52
10	Niveles de expresión del ARNm de <i>LeZDS</i> , obtenidos de discos de pericarpio de tomate bola 'Grandella' al aplicar dos mezclas de OGA a 5.0 g/L y 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L, Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L.....	54

RESUMEN

El color es un factor importante que determina la madurez, vida postcosecha y valor comercial del tomate. El color rojo del tomate se debe a compuestos carotenoides, principalmente al licopeno acumulado en los tejidos. Este fruto puede presentar problemas de coloración debido a las bajas temperaturas y a la madurez de los frutos de un mismo racimo. Por otra parte, se ha demostrado que los oligogalacturónidos (OGAs), producto de la hidrólisis del ácido poligalacturónico de las paredes celulares de los vegetales, tienen la capacidad de inducir genes relacionados al desarrollo y defensa durante la patogénesis en las plantas. En discos de pericarpio de tomate, se ha demostrado que la aplicación de OGAs induce la producción de etileno y en uvas de mesa rojas, pueden inducir la acumulación de fenoles y antocianinas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los tratamientos de OGAs de 3-20 grados de polimerización (GP) y Ethephon en los cambios de color, producción de C_2H_4 y CO_2 ; así como la acumulación de carotenoides (licopeno, β -caroteno y luteína) y la expresión de los genes *LePSY* (fitoeno sintasa) y *LeZDS* (ζ -caroteno desaturasa) en discos de pericarpio de tomate cv. 'Grandella'. Los resultados obtenidos en esta investigación señalan que bajo las condiciones aplicadas en este trabajo, los OGAs en concentraciones de 2.5 y 5.0 g/L no modifican la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides *LePSY* y *LeZDS* y por lo tanto, tampoco promueven la acumulación de licopeno, β -caroteno y luteína en discos de pericarpio de tomate. Sin embargo, se comprobó que la aplicación de 5.0 g/L de OGAs incrementan la velocidad de respiración y producción de etileno. El Ethephon en dosis de 2 mL/L induce un incremento significativo en la expresión del gen *LePSY* 24 horas después de la aplicación, promoviendo el desarrollo de color de los discos de tomate. Este es el primer trabajo donde se estudia la expresión de los genes involucrados en la síntesis de carotenoides en frutos de tomate, por la acción de los OGAs y Ethephon.

INTRODUCCIÓN

El tomate es uno de los frutos frescos y procesados de mayor importancia económica y de consumos (Mounet *et al.*, 2007). Los tomates son consumidos en su calidad organoléptica máxima la cual toma lugar al alcanzar el estado de color rojo completo antes de su ablandamientos (López-Camelo y Gómez, 2004). Uno de los principales aspectos de calidad en tomate es el color uniforme, ya que está relacionado con el grado de madurez del fruto y es un indicador de su estado fisiológico.

Los tomates producidos en invernadero, pueden presentar deficiencias en la coloración por condiciones ambientales como las altas y bajas temperaturas (INDIAAGRONET, 2000). En el caso del tomate, que es un producto de exportación, se presenta con regularidad este problema. Los productores están poniendo atención a este desorden fisiológico para resolver el problema, que es determinante en la aceptación del consumidor y que puede afectar negativamente su comercialización.

El tomate es un producto con una proporción alta de carotenoides, que le confieren la pigmentación, principalmente el licopeno (Gao *et al.*, 2008). La acumulación de carotenoides responde a las condiciones lumínicas, también se ve afectada por otros factores ambientales como las temperaturas extremas, déficit hídrico y disponibilidad de nutrientes (Manrique, 2003). La acumulación de licopeno depende de los niveles de etileno (Gao *et al.*, 2008). Siendo el tomate un fruto climatérico, tiene la cualidad de producir etileno y llevar a cabo los cambios fisiológicos necesarios para madurar y por consiguiente, producir color. A su vez, la síntesis de etileno es afectada por temperaturas superiores a los 35 °C, así como por temperaturas por debajo de los 12 °C (Wang, 1990).

El desarrollo de color en tomate está directamente relacionado con la regulación del etileno, por lo que se ha estudiado su aplicación para inducir la madurez y coloración para su comercialización (Lelièvre *et al.*, 1997). Estas aplicaciones conllevan a la activación de otros mecanismos que aceleran la maduración y llevan al fruto a senescencia.

Se ha estudiado la aplicación de compuestos derivados de la hidrólisis del ácido poligalacturónico de la pared celular de vegetales llamados oligogalacturónidos (OGAs) en plantas mostrando un comportamiento similar a una hormona. Estos están relacionados con la regulación de muchos aspectos del desarrollo tales como inhibición de la elongación de tallos inducida por auxinas, estimulación de la floración, inhibición de la formación de raíz (Simpson *et al.*, 1998). La actividad biológica de los OGAs dependen de su tamaño y grado de polimerización, que a su vez determinan el tipo de defensa que van a elicitar. Cuando tienen un grado de polimerización de 4 a 6 GP, los OGAs inducen respuestas de defensa y activan la síntesis de etileno (Simpson *et al.*, 1998). En estudios realizados por Campbell y Labavitch (1991a,b), oligómeros de bajo grado de polimerización son capaces de inducir efectos como la síntesis de etileno. En investigaciones recientes, se ha empleado la aplicación de mezclas de OGAs de grado de polimerización (GP) de 3-20 para incrementar la coloración en uvas de mesa de cultivares rojos por acumulación de antocianinas (Ochoa, 2008; Castañeda, 2010). Esto plantea la posibilidad de que la aplicación de OGAs modifique la expresión de genes de la síntesis de carotenoides, que influyan en la coloración en los frutos de tomate.

ANTECEDENTES

El Color como Índice de Calidad







El tomate puede ser apreciado por el consumidor por su color, tamaño y buen sabor. La calidad de los frutos puede definirse como la sumatoria de aspectos generales basados en estándares oficiales, entre los que se encuentran la uniformidad, frescura, color, madurez y forma de presentación (Suslow y Cantwell, 2002). Estos aspectos definen las propiedades visibles y determinan la aceptación de los productos en los mercados internacionales. La intensidad y uniformidad del color son aspectos visuales importantes del fruto, también son considerados indicadores

de sanidad y de composición química, determinante en la comercialización del producto (Shewfelt, 2003).

La calidad sensorial de un fruto, como el aspecto visual, firmeza y sabor, es de máxima importancia para su consumo. Las cualidades sensoriales dependen de numerosos factores, incluyendo el color de la fruta, la textura, el aroma, entre otros (Mounet *et al.*, 2009). El color en el tomate es una característica de calidad extremadamente importante, ya que determina la madurez del fruto. El grado de madurez es estimado visualmente comparando el color del tomate con una tabla de clasificación de tomates frescos en seis etapas, de acuerdo a la clasificación estándar de la USDA como se describe en la Cuadro 1 (De Grano y Pabico, 2007; NORMEX, 2009).

En Estado Unidos, además de la clasificación del color, se tienen otros grados de de calidad basados, principalmente, en la apariencia externa, firmeza e incidencia de magulladuras.

Cuadro 1. Clasificación estándar de la USDA de acuerdo al grado de madurez y color (NORMEX, 2007)

Grado de madurez	Color	Descripción
 1	Verde /Green	La piel del tomate está completamente verde. El color verde puede variar de claro a oscuro.
 2	Quebrando/ Breaker	Existe un rompimiento del color verde hacia colores amarillo, rosado o rojo en no más del 10% de la superficie del fruto.
 3	Rayado/ Turning	Entre el 10 y el 30% de la superficie del fruto muestra un cambio definido del color verde hasta amarillo, rosado o rojo, o una mezcla de ellos.
 4	Rosa/ Pink	Entre el 30 y el 60% de la superficie del tomate tiene color rosa o rojo.
 5	Rojo claro/ Light Red	Entre el 60 y el 90% de la superficie del tomate muestra colores rosados o rojo
 6	Rojo/ Red	Más del 90% de la superficie del tomate tiene color rojo.

Formación de Color en Tomate

En los vegetales, los pigmentos desempeñan dos funciones esenciales: son accesorios del proceso de fotosíntesis y proporcionan fotoprotección. El tomate es rico en compuestos fenólicos como: flavonoides, flavones, derivados de ácido cinámico, también de fitoalexinas, inhibidores de proteasas, glicoalcaloides y carotenoides, especialmente de licopeno y β -caroteno (Zapata *et al.*, 2007b). El color del tomate, verde al principio y rojo cuando madura, se debe a la degradación de clorofila en los cromoplastos de las células y síntesis de carotenos, entre los que destaca el licopeno (Oliva *et al.*, 2006).

Carotenoides: características y función. Los carotenoides se dividen en dos grupos: en carotenos, que contienen sólo átomos de carbono e hidrógeno, y xantofilas, que contienen átomos de oxígeno en diferentes formas químicas (Giorio *et al.*, 2007). Los carotenoides son isoprenoides de 40 carbonos que consisten en una cadena polieno con enlaces dobles, responsables del color de amarillo a rojo, con máximo de absorción de 530 nm solubles en solventes orgánicos. Los carotenoides pueden ser acíclicos, como el licopeno; cíclicos como el β -caroteno; y oxigenados como las xantofilas (Mortain *et al.*, 2008). Son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y algunos hongos y bacterias no fotosintéticos. Los animales, incluyendo al humano, no los sintetizan, aunque son fuentes esenciales de retinoides y vitamina A (Botella *et al.*, 2004).

El licopeno le proporciona el color rojo al tomate, y también actúa como un antioxidante dietario (Cháirez Jiménez *et al.*, 2007). En este fruto, el licopeno se encuentra en forma de estructuras semicristalinas unidas a la membrana de los cromoplastos o cloroplastos (Southon y Faulks, 2001). Es el pigmento más abundante al madurar el fruto con aproximadamente un 80 a 90% del total de carotenoides, el resto son β -caroteno y otros carotenoides y xantofilas (Hernández *et al.*, 2007). El licopeno ha atraído mucho la atención de los investigadores debido a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas relacionadas principalmente con la salud. Es reconocido especialmente por su propiedad antioxidante, que protege a las

células de peroxidación lipídica, daño a la membrana celular, rompimiento de ADN y degradación proteica. Estos daños son causados por especies reactivas de oxígeno que evitan la formación de diversos cánceres (Hernández *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2007a; Fraser *et al.*, 2001).

Biosíntesis de carotenoides. Genes relacionados con la síntesis de carotenoides. El tomate constituye es un buen sistema de investigación para estudiar la regulación de la biosíntesis de carotenoides. Las plantas sintetizan carotenoides por la vía del 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) (Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001) o también llamada vía de metileritriol-4-fosfato (MEP) (Botella *et al.*, 2004). Anteriormente se pensaba que se sintetizaban mediante la vía metabólica del ácido mevalónico (MVA) (Bramley, 2002). Por ambas rutas se sintetiza isopentil difosfato; sin embargo, la primera ruta forma isoprenoides plastídicos como carotenoides, fitol, plastoquinonas y diterpenos, y la segunda, esteroides, sesquiterpenoides y triterpenoides en citosol (Bramley, 2002).

El primer paso de la síntesis de carotenoides es la conversión del GGPP a fitoeno (Fraser *et al.*, 2001). La IPP (isopentenil difosfato) y la DMAPP (dimetilalil difosfato) son producidas en el compartimento plastídico a través del camino metabólico metileritrol fosfato (MEP) (Mortain *et al.*, 2008), al cual Lichtenthaler (1997) llamó camino 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP). La condensación de tres moléculas de IPP con una de DMAPP catalizada por la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa (GGDS) proporciona GGPP, precursor inmediato no solo de carotenoides, sino de la biosíntesis de giberelinas y de las colas fitol de clorofilas, filoquinonas y tocoferoles (Botella *et al.*, 2004). La condensación de dos moléculas de GGPP catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY), forma al fitoeno (Figura 1). Dos enzimas similares estructural y funcionalmente, la fitoeno desaturasa y ζ -caroteno desaturasa convierten al fitoeno a licopeno, vía ζ -caroteno (Bramley, 2002). A diversos carotenoides y sus derivados provenientes de plantas se les ha dado un valor agregado, tanto industrial como nutricionalmente. Esto se debe a sus propiedades aromáticas, colorantes, así como

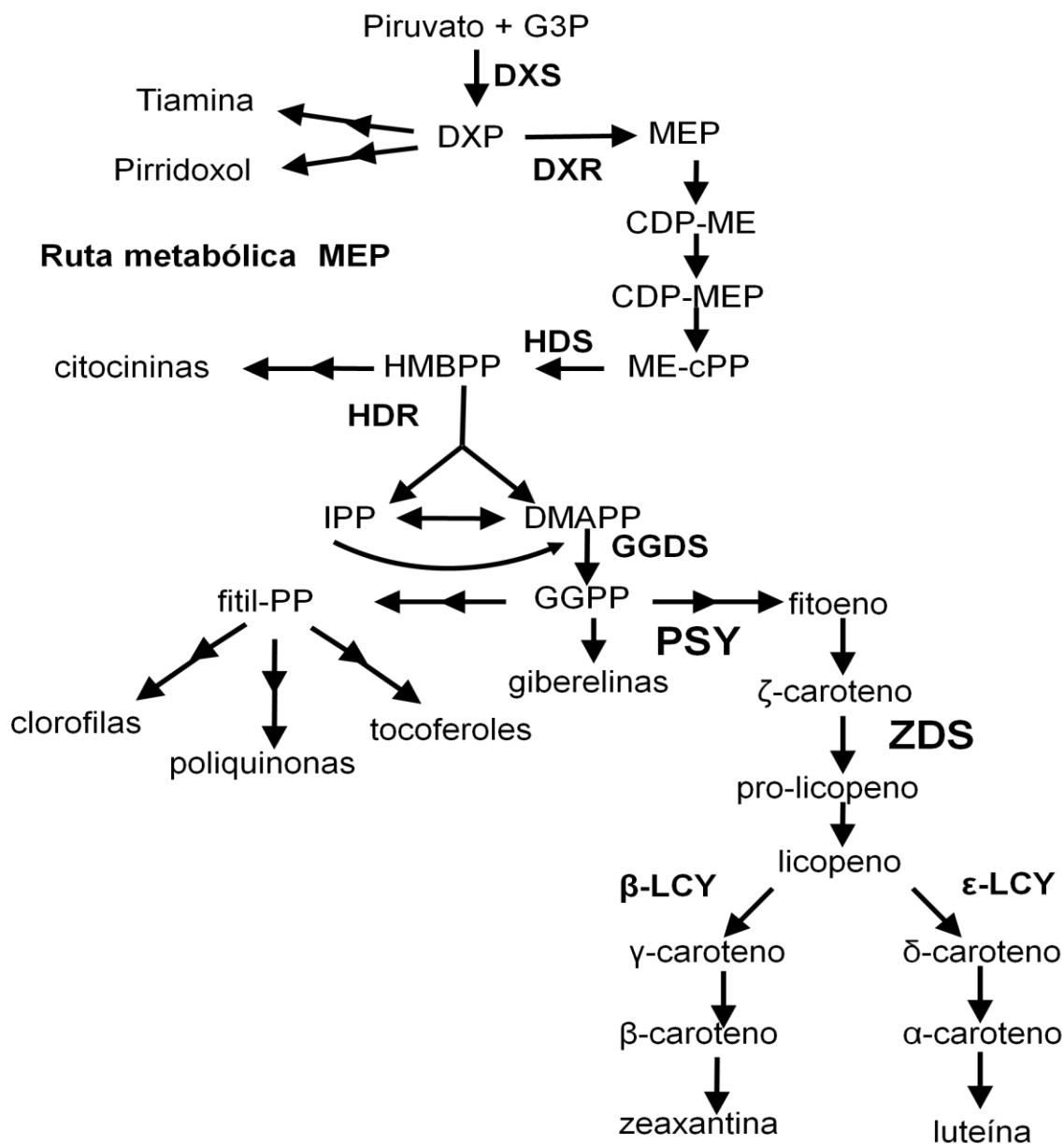


Figura 1. Vía metabólica para la biosíntesis de carotenoides en plantas. G3P, gliceraldehído-3-fosfato; DXP, deoxixilulosa 5-fosfato; MEP, metileritritol 4-fosfato; CDP-ME, 4-difosfocitidil-metileritritol; CDP-MEP, 4-difosfocitidil-metileritritol-2-fosfato; ME-cPP, metileritritol-2,4-ciclodifosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GGPP, geranilgeranil difosfato. Algunas de las enzimas biosintéticas se encuentran en negritas: DXS, DXP sintasa; DXR, DXP reductoisomerasa; HDS, HMBPP sintasa; HDR, HMBPP reductasa; GGDS, GGPP sintasa; PSY, fitoeno sintasa; ZDS, zetacaroteno sintasa; β-LCY, β-licopeno ciclasa; ε-LCY, ε-licopeno ciclasa. (Botella *et al.*, 2004).

por su actividad como provitamina A y por su capacidad de actuar como antioxidantes naturales para prevenir algunos tipos de cánceres en humanos y enfermedades degenerativas (Botella *et al.*, 2004). Esto ha llevado al desarrollo de productos ricos en antioxidantes mediante la identificación de los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides. La ingeniería metabólica en plantas para producir compuestos nuevos o mejorar la producción de los ya existentes, ha avanzado significativamente desde los 1980's. (Bramley, 2002).

La expresión de genes del camino metabólico puede ser por sobreexpresión, represión, silenciamiento, inhibición y regulación. En trabajos realizados por Botella *et al.* (2004), se han encontrado evidencias que sugieren que la primera reacción del camino metabólico MEP es catalizada por la deoxixilulosa-5-fosfato sintasa (DXS), la cual, es limitante para la biosíntesis de carotenoides durante la maduración del tomate. Además, la enzima hidroximetilbutenil difosfato reductasa (HDR), la cual sintetiza simultáneamente IPP y DMAPP al final de la ruta metabólica, está relacionada con la producción de carotenoides. La licopeno β -ciclasa (LCY-B/CTRL-E) cataliza una reacción de dos pasos, llevando a la formación de β -caroteno, mientras que la ϵ -ciclasa (LCY-E/CTRL-E) crea un anillo ϵ para producir un δ -caroteno (Bramley, 2002). En un trabajo realizado por Gao *et al.* (2008), la inhibición de la licopeno ϵ -ciclasa permitió el aumento en la síntesis de licopeno. La PSY tiene dos genes en tomate, el PSY-1 y el PSY-2 (Bramley, 2002) El primero codifica la isoforma relacionada específicamente a la maduración del fruto, mientras que la segunda predomina en tejidos verdes, incluyendo el verde maduro. La PSY-2 no está involucrada en la carotenogénesis de la maduración del tomate (Bramley, 2002). El aumento de los niveles del mRNA de la fitoeno sintasa (PSY) y la fitoeno desaturasa (PDS) controla la acumulación de licopeno (Ronen *et al.*, 1999).

La enzima PSY cataliza al primer paso para biosíntesis de carotenoides condensando dos moléculas de GGPP (C_{20}) para formar al carotenoide incoloro, fitoeno (C_{40}) (Kato *et al.*, 2004). Mediante mediciones de flujo, se ha probado que la PSY es un punto de control mayor en la biosíntesis de carotenoides en tomates (Tèlef *et al.*, 2006). Para la formación del licopeno, es necesaria la actividad de dos enzimas desaturasas para convertir al fitoeno en licopeno, las enzimas fitofloeno

desaturasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS). La PDS cataliza la conversión del fitoeno en el compuesto incoloro fitofloeno y al compuesto amarillo, ζ -caroteno. La segunda desaturasa, la ZDS, cataliza la conversión del ζ -caroteno al compuesto naranja, neurospeno, y al compuesto rojo, licopeno (Fraser *et al.*, 1994; Bramley, 2002; Marty *et al.*, 2005).

Factores que Influyen en la Coloración del Tomate

El color en el tomate es el resultado de la presencia de carotenos (Hernández *et al.*, 2007; Gould, 1983). Los carotenoides son pigmentos, la mayoría polienos que van de color amarillo a rojo. Los pigmentos más importantes en el color son: α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, δ -caroteno, licopeno y xantófilas; siendo el más abundante el licopeno, con aproximadamente el 83% de los pigmentos presentes (Gould, 1983).

El ciclo de los carotenoides es un proceso flexible que responde no sólo a las condiciones lumínicas como fluctuaciones diurnas, insolaciones puntuales o transiciones sol-sombra. También dependen de otros factores ambientales como las temperaturas extremas, el déficit hídrico o la disponibilidad de nutrientes (Manrique, 2003). El etileno juega un papel importante en la coloración del tomate, ya que la acumulación del licopeno, que es el carotenoide principal responsable de la coloración de este fruto, depende de la madurez y la disponibilidad de los niveles climatéricos del etileno (Gao *et al.*, 2008). Sin embargo, existen otros químicos usados comercialmente para extender el tiempo de vida de los frutos que inhiben la acción del etileno como el 1-metilciclopropeno (1-MCP), tiosulfato de Plata (STS), aminoetioxivinilglicina (AVG), y el 2,5-norbornadieno (2,5-NBD). Estudios realizados por Sisler *et al.* (1996), Hoeberichts *et al.* (2002) y por Wills y Ku (2002), reportaron inhibición de la coloración del tomate por acción del 1-MCP (Blankenship y Dole, 2003).

Luz y Temperatura

Es conocido que la composición química de los tomates es afectada por factores ambientales como la luz y temperatura (Hernández *et al.*, 2007). Las clorofilas y carotenoides, incluyendo al licopeno, son los principales agentes responsables del color de los tomates. Cuando comienza el proceso de maduración, la clorofila es degradada y se sintetizan los carotenoides (Hernández *et al.*, 2007). La biosíntesis de clorofila y carotenoides también son reguladas indirectamente por la luz a través del potencial redox generado durante la fotosíntesis (Pizzarro y Stange, 2009).

La regulación de la captación de la luz es necesaria para balancear la absorción y utilización de la energía luminosa, disminuyendo así el potencial de daño por foto-oxidación (Müller *et al.*, 2001). La acción individual o conjunta de diferentes factores de estrés ambiental unidos a la acción de la luz solar puede poner a prueba la capacidad de resistencia y adaptación de las plantas a un medio determinado. (Manrique, 2003). La luz representa uno de los factores más heterogéneos, espacial y temporalmente, de entre los que afectan a las plantas. La luz, por su naturaleza energética, representa además un factor de riesgo añadido en las plantas que la requieren para el proceso fotosintético (Müller *et al.*, 2001). Mientras mantienen unos pigmentos como principales responsables de la absorción energética (clorofilas), también han desarrollado otros mecanismos en los que están involucrados pigmentos accesorios para disipar de forma no dañina el exceso de energía absorbida, en caso necesario (Manrique, 2003). De acuerdo con experimentos realizados por Gautier *et al.* (2008), el aumento en la irradiación al fruto aumentó la coloración del fruto y la degradación de clorofila. Asimismo, se presentó un aumento en la concentración de carotenos y una disminución de licopeno. Esto confirma que el contenido de carotenos depende de la luz interceptada por los foto-receptores del fruto.

La biosíntesis de carotenoides es afectada por la temperatura, pero β -caroteno y licopeno muestran diferente sensibilidad. En temperaturas por encima de los 32 °C, se inhibe específicamente la acumulación de licopeno. El aumento de iluminación

lleva a la acumulación de carotenos a temperaturas favorables (Gautier *et al.*, 2008). La inhibición de la acumulación de carotenos con el aumento de temperaturas puede explicar la disminución estacional en el contenido de carotenoides (Rosales *et al.*, 2006). El aumento de temperatura del fruto de 21 a 26 °C, aumentó la coloración rojiza del fruto y la degradación de clorofila. En contraste a esto, el aumento de temperatura del fruto de 27 a 32 °C redujo la coloración rojiza y la degradación de la clorofila (Gautier *et al.*, 2008). Al aumentar la temperatura, se observó una fuerte reducción en el contenido de los precursores de licopeno, principalmente fitoeno, fitoflueno y neurospeno. A los 32 °C se observa que la síntesis de licopeno es inhibida, mientras que la síntesis de β -caroteno no se inhibió (Gautier *et al.*, 2008). Es posible especular que la luz y temperatura pudieran influir en la transcripción de los genes de maduración de frutos o en las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo primario o secundario (Gautier *et al.*, 2008; Pizarro y Stange, 2009).

Etileno

El etileno (C₂H₄) es un gas que algunas frutas y hortalizas, entre ellas el tomate, producen de manera natural durante el proceso de maduración. Concentraciones tan bajas como una parte por millón de etileno en aire, son suficientes para estimular un ablandamiento rápido y el desarrollo de color de los frutos durante el almacenamiento (Baéz-Sañudo *et al.*, 2001). El etileno puede afectar profundamente la calidad de productos cosechados. Estos efectos pueden ser benéficos o deteriorativos dependiendo del producto, su estado de madurez y el uso que se le desea dar (Watkins, 2006). En el caso de frutas carnosas, los cambios que ocurren durante la maduración imparten las características deseables del fruto tales como colores brillantes, ablandamiento y acumulación de azúcares y compuestos volátiles que le imparten el sabor y olor deseados (Barry *et al.*, 2005). La producción de etileno endógeno es esencial en la madurez de un fruto climatérico y probablemente actúa como un regulador para los procesos dependientes del etileno (Watkins, 2006). Por otro lado, la aplicación de etileno exógeno estimula la

biosíntesis de etileno, madurez del fruto, síntesis de pigmentos, degradación de clorofila, respiración y senescencia en frutos climatéricos (Nair y Singh, 2003).

En plantas superiores, la biosíntesis del etileno está bien establecida (Figura 2). El etileno se forma de metionina celular a S-adenosil-L-metionina (AdoMet) vía S-AdoMet sintetasa (SAM sintetasa) a expensas de un ATP y el aminoácido cíclico no proteico 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) se forma de AdoMet catalizado por la ACC sintasa (Wang *et al.*, 2002). El segundo paso, catalizado por la ACC oxidasa (ACCO), consiste en la conversión de ACC a etileno, CO₂ y HCN. Alternativamente, el ACC puede ser malonilado, produciendo N-malonil ACC mediante la acción de N-malonil transferasa (NMT), reduciendo la disponibilidad del sustrato para ACC oxidasa (Chaves y Mello-Farias, 2006).

Las tasas de producción de etileno se pueden mantener debido a la biosíntesis de metionina nueva. En el primer paso, donde se sintetiza ACC, la ACC sintasa produce 5-metiltioadensina, por una vía modificada del ciclo de metionina preservando el grupo metiltio en cada revolución del ciclo a costa de una molécula de ATP (Wang *et al.*, 2002). Inicialmente, se creía que la actividad de la ACC sintasa era un paso clave en el control de la producción de etileno y que la actividad de la ACC oxidasa era constitutiva. Sin embargo, el papel de esta enzima se ha vuelto más evidente, ya que el aumento de la actividad de la ACC oxidasa precede a la actividad de la ACC sintasa en frutos preclimatéricos en respuesta al etileno. Esto indica que la actividad de la ACC oxidasa es importante en el control de la producción de etileno (Alexander y Grierson, 2002).

La biosíntesis de etileno es estimulada por daño, elicitores como sistemina, oligogalacturónidos (OGAs) y jasmonato, por la inducción de la actividad de la ACC sintasa (Alexander y Grierson, 2002). La ACC oxidasa requiere de la presencia de oxígeno y bajos niveles de CO₂ para actuar, por lo que la ruta biosintética puede ser inhibida por la exposición del tejido a niveles bajos de oxígeno. La temperatura es otro factor que influye en la producción de etileno siendo óptima a 30 °C. Al incrementar la temperatura, la tasa de producción disminuye hasta que cesa a los 40 °C, ya que se afecta la actividad enzimática de ACC sintasa y ACC oxidasa, y es reversible al disminuir la temperatura. También se ve afectada la producción de

etileno al disminuir la temperatura a menos de 12 °C, por inactivación de las mismas enzimas (Wang, 1990).

Cuando la temperatura es superior a la óptima para la acción de estas enzimas y la ACC oxidasa produce niveles bajos de etileno, o en su defecto, su acción es inhibida, la producción de frutos es de bajo rendimiento y calidad, reflejado en disminución de tamaño y baja coloración. En relación a esto es que debemos buscar alternativas para solucionar este problema de descoloración que presentan los cultivos de tomate en Sonora donde las temperaturas fluctúan entre los 4 y 32 °C en los meses de cosecha octubre- abril.

Compuestos Químicos

La maduración de los frutos es un proceso complejo, genéticamente programado, que culmina en cambios dramáticos en color, textura, sabor y aroma. Debido a la importancia económica de las especies de cultivo, estos procesos han sido, y continúan siendo estudiados tanto a nivel bioquímico como genético (Alexander y Grierson, 2002). En el tomate rojo, el licopeno es el carotenoide principal, cuya acumulación depende de la maduración y disponibilidad de niveles climatéricos de etileno (Gao *et al.*, 2008). Se ha reportado que la aplicación exógena de etileno en la forma de Ethrel®, aceleró la maduración, aumentó el color y la calidad comestible con daños disminuidos en frutos de mango (Nair y Singh, 2003). El etileno o químicos etilengénicos, como Ethephon® (Ácido 2-cloroetil fosfónico), son utilizados frecuentemente para promover la maduración, junto con los cambios de color en varios productos como los melones, cítricos y tomate (Puech *et al.*, 1975).

El 1-MCP (1-Metilciclopropeno), a temperatura y presión estándar, es un gas con peso molecular 54 y una fórmula de C₄H₆, ocupa los receptores de etileno compitiendo con el etileno e inhibiendo su acción. El 1-MCP tiene una afinidad aproximadamente 10 veces mayor que la del etileno y es activo en concentraciones

más bajas que la del etileno (Blankenship y Dole, 2003). Se piensa que el 1-MCP inhibe la maduración por la ocupación de los sitios de unión del etileno, por lo que el etileno no puede unirse y elicitar la subsecuente señalización de transcripción y traducción (Liu *et al.*, 2005). Además de afectar la maduración del tomate, el 1-MCP también inhibe los índices de respiración, cambio de color y ablandamiento (Watkins, 2006).

Estudios realizados por Marty *et al.* (2005), se reportó que la aplicación de etileno, en contraste con 1-MCP, en albaricoque, regula la expresión de los primeros genes de carotenos incoloros PSY (fitoeno sintasa) y PDS (fitofloeno desaturasa) produciendo fitoeno y fitofloeno, respectivamente. Sin embargo, la enzima ZDS (Zeta-caroteno desaturasa) y la acumulación de β -caroteno son independientes de etileno. Esto lleva a considerar que el etileno es un regulador inicial de la síntesis de carotenoides, pero es necesario realizar más estudios para comprender los mecanismos de regulación de la carotenogénesis, en relación con el etileno.

Para estudiar los efectos estimulantes del etileno, se investigan inhibidores de la percepción del etileno como tiosulfato de plata (STS) e inhibidores de la biosíntesis del etileno como aminoetoxivinilglicina (AVG), el cual inhibe la enzima ACC sintasa (Locke *et al.*, 2000). Otro compuesto que bloquea la acción del etileno efectivamente es el ión plata, Ag(I). Esta propiedad del ión Ag(I) supera aquella acción del antagonista del etileno, CO₂, por lo que provee una nueva herramienta para estudiar los efectos del etileno y definir su papel en el crecimiento de la planta (Locke *et al.*, 2000). Además, el ión Ag(I) no se une irreversiblemente al etileno, y es una trampa mucho menos efectiva que el Hg(II), el cual solo tiene un efecto marginal de bloquear la acción del etileno. Este efecto pudiera explicarse en base a que el ión Ag(I) sustituye al ión Cu(I), interfiriendo en la oxidación del etileno y por lo tanto, en su acción. En contraste con el antagonista del etileno: CO₂, que muestra una cinética de inhibición competitiva clásica, el ión Ag (I) no muestra comportamiento competitivo (Beyer, 1976).

Otra manera de inhibir la carotenogénesis es con la aplicación de herbicidas. Por ejemplo, Yu *et al.* (1980) inhibieron la producción de etileno con la aplicación de 2,4-dinitrofenol que interfiere en la conversión de metionina a etileno. La clomazona

es otro herbicida selectivo que inhibe la formación de plastidios terpenoides en el cultivo de la soya (Weimer *et al.*, 1991).

Para aumentar la calidad del tomate, se han implementado sistemas especiales de producción que incluyen el uso de productos químicos como los mencionados anteriormente. La aplicación de estos productos en los frutos se hacen con el fin de prolongar la vida postcosecha, controlando así la maduración y senescencia de los frutos. En productos como la manzana, es efectivo en el control de la escaldadura superficial (Calvo, 2000).

Regulación de Síntesis de Etileno en Frutos Climatéricos

Los frutos tienen diferentes mecanismos de maduración que se pueden dividir en climatéricos y en no climatéricos. En los climatéricos, la maduración va acompañada de un pico respiratorio y un aumento de etileno. En los no climatéricos, la respiración no muestra cambios dramáticos y la producción de etileno se mantiene en un nivel muy bajo (Alexander y Grierson, 2002).

Se ha sugerido que en frutos climatéricos operan dos sistemas de regulación de etileno: el sistema 1 es funcional durante el crecimiento vegetativo, es autoinhibidor de etileno y responsable de producir niveles de etileno basal; y el sistema 2 opera durante la maduración del fruto climatérico y senescencia de algunos pétalos cuando la producción del etileno es catalítica (Alexander y Grierson, 2002). A medida que progresa la maduración en tomate, se dan cambios en el color del fruto de verde a rojo transformándose el cloroplasto a cromoplasto, degradándose la clorofila y acumulándose los carotenoides. Además de la maduración, el etileno también se involucra en otros procesos como respuestas a patógenos y heridas, senescencia de hojas y respuestas a estrés biótico y abiótico (Alexander y Grierson, 2002).

Las enzimas responsables de la formación de etileno, la ACC sintasa y la ACC oxidasa, resultan de la expresión de familias multigénicas en plantas superiores. Existen al menos nueve genes para ACC sintasa y cinco para ACC oxidasa en

tomate (Cornelius y Giovannoni, 2007). La inhibición antisentido de *LeACS2*, que es fosforilada por la ACC sintasa, redujo la síntesis de etileno en maduración a 0.1% del fruto control, llevando a un patrón anormal de maduración, con acumulación reducida de licopeno, ablandamiento retrasado y un pico climatérico muy reducido. Cuando el nivel de actividad de la ACC oxidasa es mayor que el requerido en los tejidos vegetales, puede mostrar un aumento dramático en actividad de maduración del fruto en respuesta al etileno al que se expone. La familia de genes de ACC oxidasa se expresan por respuesta a estímulos asociados a la maduración, daño al tejido, el estado de desarrollo celular, en particular, en la senescencia, y por el mismo etileno (Saltveit, 1999).

Se han aislado y caracterizado 6 receptores de etileno en tomate. Las estructuras predichas de la familia de receptores *LeETR* son similares a las de *Arabidopsis*, solo el receptor *LeETR3* carece de dominio receptor, y al menos uno de tres posibles (*LeETR4±6*) no tienen conservado completamente los dominios de histidina cinasa (HK). A pesar de las diferencias estructurales entre ellos, se ha demostrado experimentalmente que se pueden unir al etileno a excepción de la *LeETR6* (Klee, 2002). Aparentemente, los receptores son reguladores negativos de etileno; es decir, un receptor en ausencia de etileno suprime activamente la expresión de un gen inducido por etileno, mostrando una correlación inversa entre los niveles del receptor y la sensibilidad al etileno del tejido. Esto debe tomar más etileno para inactivar los niveles altos de receptores para aliviar la represión y viceversa (Klee, 2002).

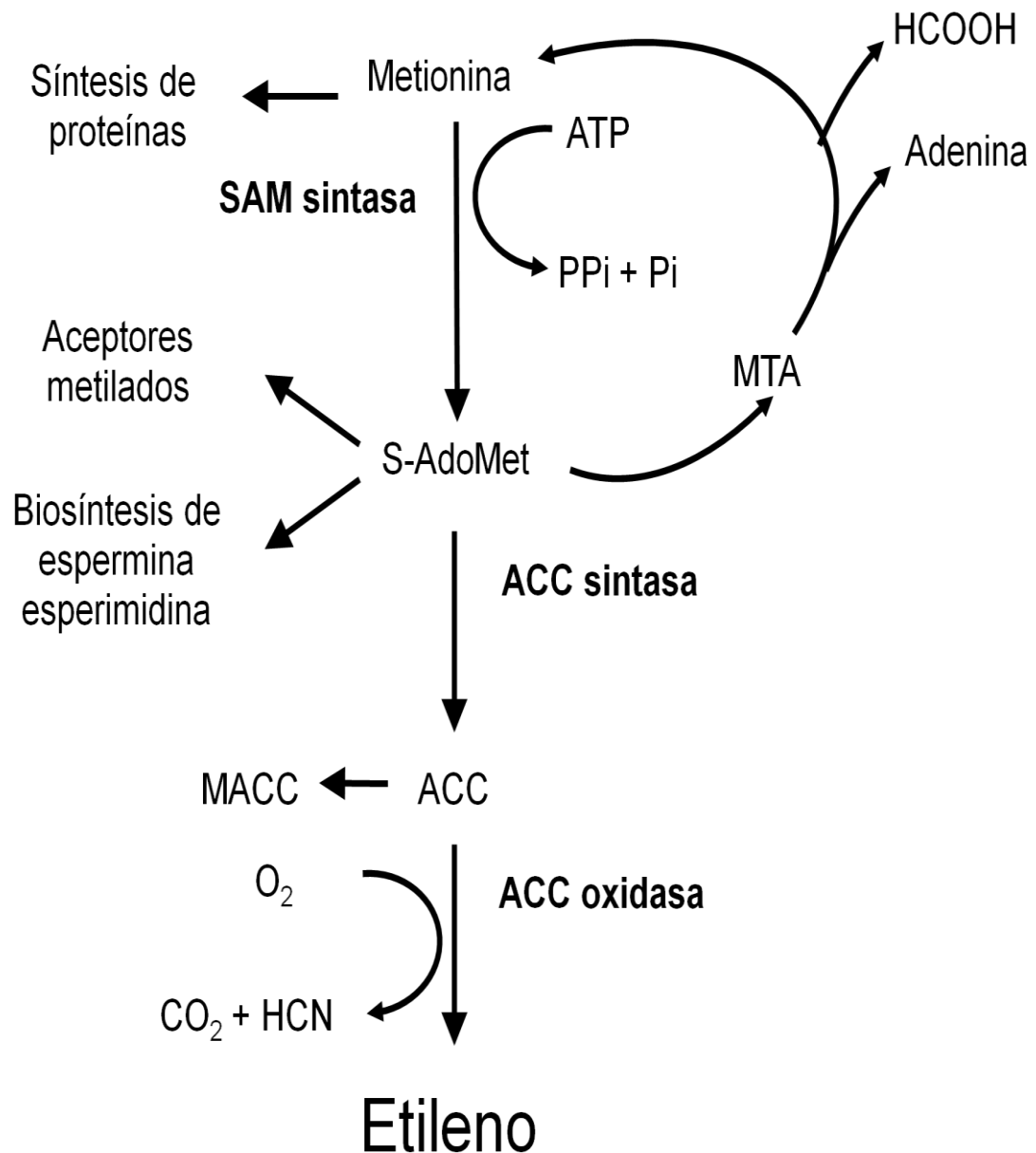


Figura 2. Biosíntesis de etileno. S-adenosil metionina sintetasa (SAM sintetasa), S-adenosil-L- metionina (S-AdoMet), 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintetasa (ACC Sintasa), 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa (ACC oxidasa), 5-metiltoadenosina (MTA), Malonil 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (MACC).

Oligogalacturónidos: su Origen y Función

Los oligogalacturónidos (OGAs), son compuestos que de manera natural son liberados de los polisacáridos pécticos que componen la pared celular durante la degradación de estas estructuras por las enzimas pécticas de la propia planta o proveniente de los microorganismos que invaden los tejidos vegetales (Darvill y Albersheim, 1992; Satoh, 1998). De manera artificial los OGAs se generan a partir de la hidrólisis ácida o enzimática de ácido poligalacturónico (PGA), derivado de la pectina de la pared celular de vegetales, liberando oligosacáridos lineales de residuos de ácido α -D-(1 \rightarrow 4)-galactosilurónico (Spiro *et al.*, 1993). Se ha visto que los α -1 \rightarrow 4 oligogalacturónidos han elicitedo varias respuestas de defensa; sin embargo, no todos los OGAs son capaces de elicitar respuestas de defensa, ya que requieren un grado de polimerización (GP) entre 10 y 15 unidades (Osorio *et al.*, 2008; Osborne y McManus, 2005).

Los fragmentos de ácido galacturónico derivado de pectina, actúan con efectos similares a las hormonas. Ejemplos de estas acciones son la inhibición de la elongación de tallo de chícharo inducida por auxina, y la estimulación de la floración y la inhibición de formación de raíz en explantes de tabaco (Simpson *et al.*, 1998). Otros efectos son la inducción de cambios relacionados a la defensa, incluyendo la expresión del gen inhibidor de proteinasa, expresión de genes relacionados a la patogénesis como quitinasa y β -1-3 glucanasa y producción de fitoalexinas (Simpson *et al.*, 1998).

Los α -1 \rightarrow 4 oligogalacturónidos (OGAs) inducen rápidamente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de la cascada de MAP cinasa (Aziz *et al.*, 2004). Esto resulta en una estimulación de la ruta de los fenilpropanoides y la acumulación de componentes con actividades antimicrobianas, tales como fitoalexinas y proteínas relacionadas a patogénesis (Aziz *et al.*, 2004). Los OGAs también inducen la lignificación de la pared celular, la producción de etileno en tomate, y la inhibición de la elongación inducida por auxinas en tallos de chícharos (Branca *et al.*, 1988). También se ha visto que elicitan un aumento en la fosforilación

de proteínas en las membranas de tomate y papa (Farmer *et al.*, 1989), el flujo transmembranal de iones acompañado por depolimerización de células en suspensión en tabaco (Mathieu *et al.*, 1991) y protoplastos en zanahorias (Messiaen *et al.*, 1993), y la acumulación de peróxido en la suspensión de células de soya cultivadas (Apostol *et al.*, 1989; Spiro *et al.*, 1998).

Oligogalacturónidos y su Relación con Etileno

El uso indiscriminado de productos químicos en la agricultura ha provocado un efecto desfavorable sobre la calidad biológica de los alimentos, siendo derrochadores de energía y alteran completamente las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos (Ruiz *et al.*, 2009). Esto le da relevancia a la búsqueda de compuestos alternativos que puedan utilizarse en la agricultura orgánica sustituyendo o disminuyendo el uso de químicos sintéticos (Ruiz *et al.*, 2009; Enriquez *et al.*, 2010). En diversas investigaciones, se ha descubierto que algunos componentes de plantas y organismos fitopatógenos o moléculas liberadas por ellos actúan como efectores biológicos en diversos cultivos de interés agrícola (Enriquez *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que los oligosacáridos liberados de la pared celular por heridas o ataque de patógenos, juegan un papel importante en la regulación de varias respuestas de las plantas, incluyendo la biosíntesis de etileno (O'Donnell *et al.*, 1996). Como los oligosacáridos son liberados de las paredes celulares durante la maduración, se han propuesto como reguladores de este proceso (Campbell y Labavitch, 1991a). Los OGAs de 4-6 grados de polimerización (GP) pueden inducir la expresión de ACC oxidasa en hojas de tomate después de una hora de tratamiento (Osborne y McManus, 2005).

En particular, se sabe que los oligómeros pécticos inducen respuestas de daño y defensa en muchas plantas y la biosíntesis de etileno transitoria en discos de pericarpio de tomate (Campbell y Labavitch, 1991b) y en suspensiones de células de pera con un grado de polimerización de 7-9 (Campbell y Labavitch, 1991a). Con la aplicación de dos tratamientos con GP 7-9, se observó una respuesta normal de

etileno en tejidos dañados, pero en la aplicación de dos tratamientos con GP 10-12, se observó una disminución en la respuesta de etileno. Este descenso no se debe a la disminución de la actividad de la ACC oxidasa inducida por el primer tratamiento (Campbell y Labavitch, 1991a).

Para muchas respuestas de la planta, los oligómeros con GP >10 son activos, atribuido a la habilidad de los OGAs con GP >~9 para formar complejos multioligoméricos con iones calcio para interactuar con receptores superficiales (Campbell y Labavitch, 1991 a,b; Simpson *et al.*, 1998). Sin embargo, los OGAs pequeños no forman estos complejos, pero inducen efectos como respuesta a daño en plantas de tomate. Los oligogalacturónidos con 2-6 GP son capaces de inducir la acumulación de proteínas inhibidoras de proteasas, así como la elicitación de producción de etileno (Simpson *et al.*, 1998).

En tejidos dañados de plantas, el etileno es liberado y participa en la respuesta a la señalización por daño en interacción con compuestos como los oligogalacturónidos (Ryan, 2000). El camino de señalización por daño dispara al mecanismo de defensa que actúa usualmente contra herbívoros, pero en algunos casos pueden ser efectivos contra patógenos también (Díaz *et al.*, 2002). Se puede pensar que *Botrytis cinerea* induce el ataque de una respuesta similar a la de daño debido a que su infección puede resultar en la liberación de OGAs a través de la acción de endo poligalacturonasas fúngicas (endoPGs) expresadas durante la patogénesis (Díaz *et al.*, 2002).

En discos de tomate verde maduro, la biosíntesis de etileno y la respiración en tejidos dañados llevan a cabo un aumento climatérico, cambios de color de verde a rojo, ablandamiento de tejido (Campbell *et al.*, 1990). También se observa un aumento en enzimas hidrolíticas, cambios en la composición de la pared celular y desarrollo de aromas y sabores característicos con un patrón similar al observado en frutas intactas (Campbell y Labavitch, 1991b).

HIPÓTESIS

Los oligómeros derivados de ácido poligalacturónico modifican la expresión de genes PSY y ZDS que intervienen en la biosíntesis y acumulación de carotenoides que aportan color a los frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la aplicación de OGAs de 3-20 GP y Ethephon en los cambios fisiológicos, cuantificación de licopeno, β -caroteno y luteína, y en la expresión de genes de la biosíntesis de carotenoides en discos de frutos de tomate en estado verde maduro.

Objetivos Específicos

Evaluar el efecto de los tratamientos de OGAs (2.5 y 5.0 g/L) y Ethephon (2 mL/L), en los cambios de velocidad de respiración (CO_2), producción de etileno y color en discos de pericarpio de frutos de tomate en estado verde maduro (VM 2 y 3).

Evaluar los cambios en el contenido de los carotenoides licopeno, β -caroteno y luteína en discos de pericarpio de frutos de tomate en estado verde maduro (VM 2 y 3) por efecto de la aplicación de OGAs (2.5 y 5.0 g/L) y Ethephon (2 mL/L).

Analizar la expresión de los genes que codifican para fitoeno sintasa (PSY) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS) por RT-PCR en discos de pericarpio de frutos de tomate en estado verde maduro (VM 2 y 3) en respuesta a la aplicación de OGAs (2.5 y 5.0 g/L) y Ethephon (2 mL/L).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de Oligogalacturónidos (OGAs)

Se obtuvieron por hidrólisis enzimática a partir de ácido poligalacturónico (APG) (Sigma-Aldrich, México) en ácido acético glacial (20 mM) y acetato de sodio (NaOAc 20 mM) a pH 5. Se usaron 15 U de la enzima pectinasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, México) a 23 °C durante 15 minutos, deteniendo la reacción a 121 °C por 15 minutos. Se llevó a cabo una ultrafiltración en membranas Millipore con corte de 5 a 10 KDa recuperando la fracción entre estos tamaños de partícula (Torres, 2005). El filtrado obtenido se liofilizó empleando un liofilizador marca Vitris Sentir Freezemobile 12 SL (Labconco, USA). Posteriormente, se determinó su grado de polimerización en un sistema de cromatografía de intercambio aniónico con detector de pulsos amperométricos (HPAE-PAD), Dionex ICS-250 (Sunnyvale CA, USA). Esta mezcla se utilizó para los tratamientos.

Material Vegetal

Los discos utilizados en este experimental se obtuvieron de frutos de tomate bola de la variedad 'Grandella', cultivados en el invernadero Ceiba de la Cuchilla, del poblado Marte R. Gómez, en el municipio de Cajeme, Sonora. Se recolectaron tomates en estado verde maduro (VM) libres de golpes, raspaduras y daños por insectos. Los frutos se transportaron al laboratorio de Fisiología Vegetal en CIAD, unidad Hermosillo a temperatura ambiente. Se desinfectaron con una solución de cloro al 1% y se secaron para la preparación de discos.

Discos como modelo de estudio

La maduración del fruto de tomate es un fenómeno complejo donde se observan cambios en el color, la textura, sabor y aroma, y en cada tejido resultan

cambiar sus patrones locales de expresión de genes y actividad metabólica. El uso de discos ofrece numerosas ventajas para análisis experimentales, permitiendo la separación de varios procesos de maduración aislando tejidos específicos, adición cuantitativa de intermediarios o inhibidores metabólicos a estos tejidos, medidas precisas de procesos locales mediante monitorio no destructivo, así como análisis destructivos de replicados (Campbell *et al.*, 1990; Campbell y Labavitch, 1991a,b; Saltveit, 2005). En esta investigación se optó por el uso de discos de pericarpio de tomate cv. 'Grandella', ya que son un modelo de estudio que ofrece estas ventajas.

Preparación de discos de pericarpio de tomate

En una campana de flujo laminar estéril, se prepararon los discos de frutos en estado verde maduro, utilizando un sacabocados de 1.5 cm de diámetro. Los discos se obtuvieron del pericarpio de la zona ecuatorial del fruto en estado verde maduro 2 y 3 (VM2, VM3), eliminando el material locular adherido para obtener discos de 5 mm de grosor. Cada disco pesó aproximadamente 1 gramo \pm 0.1 g. Una vez preparados los discos, se enjuagaron dos veces durante 30 s por inmersión en agua deionizada estéril, se secaron los discos sobre papel filtro estéril y se colocaron 15 discos en cada placa Petri estéril. Se colocó una torunda de algodón con agua estéril para mantener la humedad. Se dejaron reposar 12 h a temperatura ambiente para disminuir el estrés por corte y posteriormente aplicar los tratamientos.

Diseño de Experimentos

Se aplicaron ocho tratamientos de los cuales, dos fueron soluciones de OGAs en concentraciones de 2.5 g/L y 5.0 g/L, así como un tratamiento de aminoetoxivinilglicina (AVG) 10 mM más OGA 5.0 g/L y otro de Ethepon de 2 mL/L más OGA 5.0 g/L. También se aplicó una solución de Ethepon a 2 mL/L, un control

negativo de AVG 10 mM, como control positivo AVG 10 mM más Ethephon 2 mL/L. Se utilizó agua deionizada estéril como testigo.

Aplicación de Tratamientos

Se aplicaron 30 μ L de los tratamientos acuosos a cada disco de tomate por placa en la superficie de corte, aplicando cada tratamiento a 15 discos por 24 placas por tratamiento. Se muestrearon 3 placas por día a los 0, 1, 4, 8, 11 y 14 días después de aplicados los tratamientos. A las muestras se les midió color y producción de etileno y dióxido de carbono. Se congelaron a -20 °C para su posterior análisis de la expresión de los genes de la biosíntesis de carotenoides, fitoeno sintasa (PSY) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS), así como cuantificación de carotenoides.

Análisis Fisiológicos

Determinación de la producción de Etileno y CO₂

La determinación se realizó en discos de tomate. Se colocaron tres discos de una misma placa en un vial con septa de 24 mL perfectamente sellado durante una hora, midiendo tres placas por tratamiento. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Varian Star modelo 3400) con detectores de conductividad térmica sensible al CO₂ (TCD) y otro de ionización de flama sensible al etileno (FID). Se utilizó nitrógeno como gas acarreador de la muestra, hidrógeno y aire comprimido para la llama del detector de ionización. La columna utilizada fue Hayasep-N de 2 m de longitud con un diámetro interno de 1/8". Las condiciones de separación fueron 100 °C para el inyector, 80 °C para la columna, 170 °C para el detector TCD y 120 °C para el FID (Watada y Massie, 1981). Se inyectó 1 mL por cada muestra y se utilizaron estándares externos (1 μ M de etileno y 5% mol/mol de CO₂). Las áreas se le calcularon con el programa Star Chromatography Workstation (StarWS) versión 6.0 (Varian Inc., 2002). Las concentraciones de etileno y CO₂ se calcularon utilizando las siguientes fórmulas:

$$mL \text{ CO}_2/\text{Kg h} = \frac{(\text{Área muestra})(\text{Volumen})(\text{Concentración de referencia})}{(\text{Área de referencia})(\text{Tiempo})(\text{Peso})}$$

$$\mu\text{L Etileno}/\text{Kg h} = \frac{(\text{Área muestra})(\text{Volumen})(\text{Concentración de referencia})}{(\text{Área de referencia})(\text{Tiempo})(\text{Peso})}$$

Donde:

<i>Área de la muestra</i> =	Calculada mediante software StarWS
<i>Área de referencia</i> =	Área del estándar calculada mediante software StarWS
<i>Volumen</i> =	Volumen del espacio de cabeza (mL)
<i>Concentración de referencia</i> =	Concentración estándar, 1 μM etileno y 5% mol/mol CO_2
<i>Tiempo</i> =	Tiempo de incubación de las muestras (h)
<i>Peso</i> =	Peso de la muestra (Kg)

Color

El cambio de color en la madurez del fruto se debe a los cambios en dos pigmentos principales: a la degradación de clorofila y a la acumulación progresiva de licopeno en el cloroplasto. La mayoría de la literatura de tomate en la cual se expresa el cambio de color en los frutos, se expresan mediante combinaciones matemáticas entre b^* y a^* en el plano ecuatorial cromático. Algunos autores utilizan sólo valores de a^* , mientras que otros utilizan la relación entre a^*/b^* . Esta índice se ha utilizado para expresar los cambios de color a temperaturas constantes o de campo (López-Camelo y Gómez, 2004; Hernández *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2007b; Batu, 2004).

Se midió el color de los discos con un colorímetro Minolta CR-300 en la escala L^* , a^* , b^* , registrándose los índices de color en discos de tomate 'Grandella' en y

relación a*/b*. Se realizaron 10 mediciones por placa, y 3 placas para cada tratamiento. De acuerdo a lo establecido por López-Camelo y Gómez (2004).

Cuantificación de Licopeno, β -Caroteno y Luteína

Se utilizó la metodología descrita por Lin y Chen (2003). A partir de 8 g de discos de pericarpio de tomate, se homogenizó con 0.2 g MgCO_3 y 40 mL solvente etanol: hexano (4:3, v/v). Se agitó la mezcla a 140 rpm por 30 min. Se colectó la fase superior y se colocó en un matraz de 500 mL. Se continuó la extracción a la fase inferior con 32 mL de la mezcla de solventes, a 140 rpm por 30 min. Se colectó de nuevo la parte superior y se transfirió al matraz. Se hicieron tres extracciones a la fase inferior con 15 mL de hexano agitando durante 20 min. Seguido a esto, se añadieron 5 mL de hexano y se homogenizó a 12 000 rpm durante 5 minutos. Se filtraron los extractos y la fase homogenizada a través de un papel filtro Whatman No. 1, y se juntaron en el mismo matraz. Se agregaron 150 mL de agua destilada y 100 mL de solución de NaCl al 10% para dividir las fases. El sobrenadante se evaporó bajo vacío en un rotovapor. El residuo se disolvió en 1 mL de diclorometano y se filtró para su purificación con un filtro Acrodisc CR 4 mm marca Pall ® con una membrana PTFE a 0.45 μm ; posteriormente, se transfirió a un vial ámbar.

Posteriormente, se inyectaron 60 μL del filtrado a un sistema HPLC HP serie 1100 equipado con detector de diodo, columna C30 fase reversa (4.6 mm x 150mm) con tamaño de partícula de 3 μm . Como sistema de solventes se utilizó: 1-butanol-acetonitrilo (30:70, v/v) (A) y cloruro de metileno (B) con el siguiente gradiente de elución: 99% A y 1% B inicialmente, aumentando a 4% B en 20 min, 10% B en 50 min y regresar a 1% B en 55 min. La tasa de flujo fue de 2.0 mL/min con detección a 476 nm y sensibilidad a 0.005 AUFS. Los picos de carotenoides detectados fueron comparados y confirmados utilizando estándares comerciales de carotenoides provenientes de la casa comercial Sigma-Aldrich. Para la determinación de la

concentración de los carotenoides se realizó una curva de calibración de los estándares comerciales de all-trans-licopeno, β -caroteno y luteína (xantofila). Los datos se expresaron en mg del carotenoide por 100 g de peso fresco. Los datos se obtuvieron con el software Chem Station (Rev.B.03.01, Alemania).

Estudio Molecular

Extracción de ARN Total

La muestra se obtuvo homogenizando los discos de pericarpio de tomate de cada tratamiento en un mortero de cerámica con nitrógeno líquido. Se utilizaron 100 mg de muestra por cada extracción de ARN total. Se utilizó el juego de reactivos comerciales Concert Plant Reagent® para la extracción del ARN total, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se midió la concentración final en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). Se analizó la integridad del ARN total mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con una solución amortiguadora TBE 0.5X con intensidad de corriente de 65 watts por 60 minutos y se utilizó un marcador RNA Ladder (Invitrogen, USA). Se capturó la imagen del gel teñido con bromuro de etidio e irradiado con luz UV.

Síntesis de ADN Complementario (ADNc)

La síntesis de ADNc se llevó a cabo mediante el juego de reactivos comerciales SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA). Con estos reactivos se realizó la síntesis de la cadena del ADN por medio de la enzima transcriptasa reversa. Para inactivar la reacción, las muestras se incubaron a 42 °C durante 50 min, 70 °C / 15 min y 37 °C / 20 min.

Diseño de Oligonucleótidos Específicos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia nucleotídica del genoma del tomate, los cuales se utilizaron para amplificar los genes que codifican para las enzimas fitoeno sintasa (PSY) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS). Las secuencias de *LePSY1* y *LeZDS* fueron obtenidas del banco de genes GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), con número de acceso M84744 y AF195507 respectivamente. En el Cuadro 2 se presentan las características de los oligonucleótidos diseñados.

Cuadro 2. Características de los oligonucleótidos diseñados.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Longitud(nt)	G+C (%)	Tm (°C)
LePSYF1	GTA CGG TCT GCT ATT TTG GC	20	50	53.8
LePSYR2	ATC AAC CCA ACC GTA CCA G	19	52.6	54.7
LeZDSF1	TAA AGG GGG TGA AAT AGG G	19	47.3	51.2
LeZDSR2	ACG GTA ACA ACA GGC ACT C	19	52.6	55.1
LeGAPDHF1	GCC AAG AAG GTT GTG ATC TC	20	50	53.5
LeGAPDHR2	CTG TAA CCC CAT TCG TTG TC	20	50	53.5

Nt: nucleótidos; G+C: porcentaje de guanidina y citocina; Tm: temperatura de fusión.

Amplificación de *LePSY* y *LeZDS*

Las secuencias se amplificaron mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR). Las condiciones de amplificación para los genes anteriores fueron 30 ciclos de 95 °C/ 1 min, 62 °C/ 40 s y 72 °C/ 2 min para *LePSY* y 35 ciclos de 95 °C/ 1 min, 54 °C/ 40 s y 72 °C/ 2 min para *LeZDS*. Se utilizó un termociclador PTC-200 ADN Engine Cycler (MJ Research, USA). Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1% con una solución amortiguadora TBE 0.05%. Se capturó el gel teñido en una solución de bromuro de etidio e irradiado con luz UV. Se utilizó como marcador de peso molecular el PCR Marker (Invitrogen, USA). El

análisis de la expresión de genes se llevó a cabo de forma semicuantitativa mediante densitometría, utilizando el programa KODAK 1D v. 3.6.1 (2002). Se calculó la expresión relativa del gen problema con respecto al gen constitutivo *LeGAPDH*

Análisis de los Datos

El análisis estadístico de los resultados se realizó usando el programa estadístico NCSS (2007). Para las respuestas fisiológicas y expresión de genes se utilizó un diseño completamente al azar por cada día, entre tratamientos. Se realizaron comparaciones de medias por el método de Tuckey, para encontrar diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Se utilizó como unidad experimental una placa de discos de pericarpio de tomate.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de la Mezcla de Oligogalacturónidos

Se realizó una hidrólisis enzimática con pectinasa de *Aspergillus niger*, utilizando con sustrato ácido poligalacturónico (APG) (SIGMA-Aldrich), obteniendo una mezcla de oligogalacturónidos (OGAs) mediante el procedimiento descrito por Torres (2005). En la Figura 3, se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de cromatografía de intercambio aniónico con pulsos amperométricos (HPAEC-PAD), en la cual se observa que la mezcla de OGAs presenta grados de polimerización (GP) entre 3 y 20. Estos resultados se determinaron con un estándar de OGA de 11 GP. La mezcla de OGAs de 3-20 GP obtenida se utilizó en los tratamientos aplicados a discos de tomate bola cultivar 'Grandella' en concentraciones de 5 y 2.5 g/L.

Algunos oligosacáridos derivados de la pared celular de plantas y hongos poseen actividad elicitora en plantas, el tipo de efecto y especificidad varían según las características fisicoquímicas de la oligosacarina y la especie vegetal que percibe la señal (Enriquez *et al.*, 2010). Para analizar la especificidad de la acción de los OGAs, es esencial definir el tamaño de la estructura (GP) que es reconocida por la planta y que pudiera interactuar con un receptor de superficie (Simpson *et al.*, 2008). Se han realizado estudios donde los OGAs con $GP > 9$ muestran ser potentes inductores de respuestas en plantas (Cabrera *et al.*, 2008; Simpson *et al.*, 1998; Darvill *et al.*, 1992). Se han realizado estudios donde los OGAs con un $GP < 8$ inducen depolimerización de la membrana plasmática en tabaco, inducción de proteínas inhibitoras de proteasas en tomate e inducen la síntesis de etileno en diversos frutos como tomate, pera, calabacín, uva de mesa (Darvill *et al.*, 1992; Campbell y Lavabitch, 1991a,b; Balandrán, 2005; Ochoa, 2008, Castañeda, 2010).

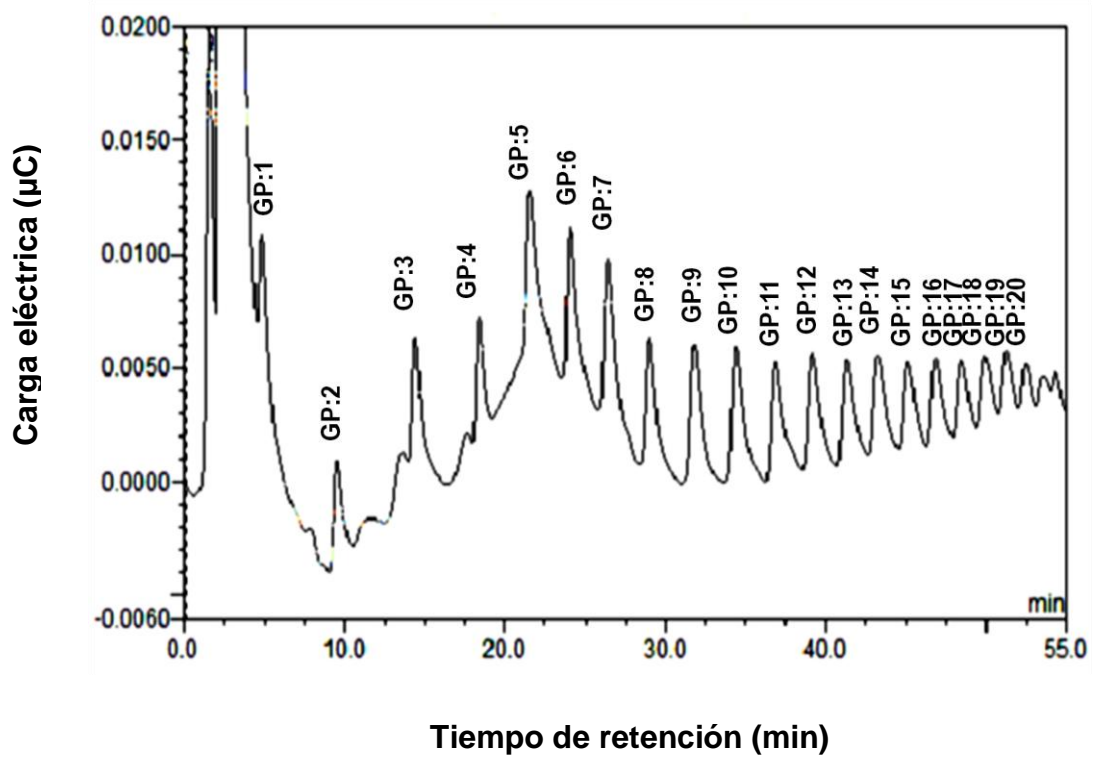


Figura 3. Mezcla de oligogalacturónidos de 3-20 grados de polimerización (GP), evaluado por cromatografía de intercambio aniónico con detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD). La mezcla se obtuvo a partir de la hidrólisis de ácido poligalacturónico con pectinasa de *Aspergillus niger*.

En recientes investigaciones realizadas por Ochoa (2008) y Castañeda (2010), se observó que las mezclas de OGAs de 3-20 GP inducen la formación de color en uvas de mesa 'Flame Seedless', así como también se observó que los OGAs promueven la acumulación de antocianinas y se incrementa la capacidad antioxidante del fruto. El grado de polimerización obtenido en este estudio, de 3-20 GP, es similar al obtenido por Torres (2005), Ochoa (2008) y Castañeda (2010). En esta investigación, esta mezcla se utilizó para evaluar su acción biológica en la inducción de color, acumulación de carotenoides y expresión de los genes relacionados a la biosíntesis de carotenoides en discos de tomate bola cv. 'Grandella'.

Velocidad de respiración

En general para las frutas y hortalizas, la velocidad de respiración (VR) es inversa a la vida postcosecha de éstas (Kader y Salveit, 2003). En el Cuadro 3 se presentan los valores de velocidad de respiración de los discos de pericarpio de tomate bola 'Grandella' a los que se le aplicaron los tratamientos de OGAs y Ethephon. Se observó que al inicio del experimental (día 0) la VR de los discos fue de 39.90 mL/kg•h de CO₂. Al día 1, después de la aplicación de los tratamientos, se presentaron diferencias significativas en la producción de CO₂ de los tratamientos con respecto al control ($p \leq 0.05$), donde los tratamientos OGA 2.5 g/L, Ethephon y Ethephon más OGA (44.53, 49.42 y 46.13 mL/kg•h de CO₂) fueron 0.36, 0.51 y 0.41 veces superiores que el control (32.56 mL/kg•h) respectivamente ($p \leq 0.05$). El control y el tratamiento OGA 5.0 g/L (41.45 mL/kg•h) fueron estadísticamente iguales ($p \geq 0.05$). El día 4, después de la aplicación de los tratamientos, se detectaron diferencias significativas con un comportamiento inverso al día 1. El control presentó un valor de 48.08 mL/kg•h siendo significativamente más alta que los otros tratamientos ($p \leq 0.05$). Sin embargo, se puede observar que se disminuyeron los

índices de respiración en los demás tratamientos. En los días 8 y 11 después de la aplicación de los tratamientos, no se presentaron diferencias significativas, manteniéndose valores constantes entre 23.28 a 30.83 mL/kg•h. Al día 14, se observaron diferencias en la producción de CO₂ entre los diferentes tratamientos ($p \leq 0.05$) siendo Ethephon (26.22 mL/kg•h) el tratamiento con la respuesta de respiración más alta. Los tratamientos control, OGA 5.0 g/L y Ethephon + OGA 5.0 g/L muestran una igualdad estadística a Ethephon con medias de 20.50, 24.77 y 25.45 mL/kg•h de CO₂, respectivamente ($p \geq 0.05$).

En tomates enteros en estado de madurez verde maduro, la VR es de 15 a 26 mL/kg•h de CO₂ a 25 °C (Suslow y Cantwell, 2010). En una investigación realizada por Campbell *et al.* (1990), compararon la velocidad de respiración en frutos enteros y discos de pericarpio de tomate donde el CO₂ aumenta de 13 a 43 mL/ kg•h, dos a tres veces en discos verde maduro al del fruto intacto verde maduro. La alta producción de CO₂ en los discos de tomate es un indicador del inicio de los procesos de la maduración asociándola con la producción de etileno (Salveit, 2005).

Se ha mostrado que la modificación de factores ambientales, mecánicos y biológicos producen cambios en la actividad respiratoria incrementando la respiración en condiciones de estrés (Rivas-Carbó *et al.*, 2008; Kader y Saltveit, 2003). La aplicación de OGAs indujo una elevación en la respiración con respecto al Control mostrando diferencia estadística en la mezcla de OGAs de 2.5 g/L; sin embargo, para la mezcla de 5.0 g/L de OGAs no mostró diferencia contra el Control. En un estudio realizado por Balandrán (2003) en discos de calabaza zucchini, al aplicar mezclas de OGAs en diferentes concentraciones de 1, 10 y 100 µg por disco, encontró una disminución de la tasa respiratoria en las primeras 10 h, pero una tasa más alta de respiración con la mayor concentración de OGAs. Al día 14, la acción de los OGA 2.5 g/L, por su baja concentración, mantiene reducida la tasa de respiración de los discos, en comparación con Ethephon, la cual mantiene una tasa alta de respiración la cual puede llevar al tejido a senescencia.

En el transcurso de los días se pudo observar la disminución de la tasa de respiración en los discos de pericarpio tratados. La alta producción de CO₂ en los discos de tomate es un indicador del inicio de los procesos de la maduración asociándola con la producción de etileno. Cualquier estrés es capaz de perturbar la respiración con un aumento sustancial en ésta el cual se asocia al aumento en la evolución del etileno (Salveit, 2005). Poco se ha estudiado la relación entre el CO₂ y los OGAs, en esta investigación, se puede ver que los OGAs pueden prolongar la vida de los discos de tomate al verse una disminución de la tasa respiratoria al aplicarlos en la concentración de 2.5 g/L.

Cuadro 3. Tasa respiratoria (mL/kg•h de CO₂ a 25 °C) en discos de pericarpio de tomate bola de la variedad ‘Grandella’ en estado verde maduro, por efecto de una mezcla de OGAs de 3-20 GP y Ethephon.

Tratamientos	Días después de aplicación					
	0	1	4	8	11	14
Control	39.90 ^a	32.56 ^a	48.08 ^b	30.83 ^a	19.72 ^a	20.50 ^{ab}
OGA 5.0 g/L	39.90 ^a	41.45 ^{ab}	29.96 ^a	31.03 ^a	29.20 ^a	24.77 ^{ab}
OGA 2.5 g/L	39.90 ^a	44.53 ^b	24.47 ^a	24.58 ^a	28.38 ^a	17.16 ^a
Ethephon 2 mL/L	39.90 ^a	49.42 ^b	31.40 ^a	23.28 ^a	18.66 ^a	26.22 ^b
Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L	39.90 ^a	46.13 ^b	23.02 ^a	27.03 ^a	23.80 ^a	25.45 ^{ab}

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Las letras similares por columna son estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

Producción de Etileno

La biosíntesis del etileno en discos de pericarpio de tomate experimenta dos aumentos transitorios: uno inmediato después de la escisión, y el segundo durante los procesos de cambio de color (Campbell *et al.*, 1990). En el Cuadro 4, se presentan los niveles de etileno de discos de tomate del control y los tratamientos con 2.5 y 5.0 g/L de OGAs y 2 mL/L de Ethephon. Al inicio del experimental (día 0), se presentó una producción de etileno de 1.7490 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$ después de la escisión de los discos. Al día 1 después de la aplicación de los tratamientos, los datos de los tratamientos de 2.5 y 5.0 g/L de OGAs fueron estadísticamente iguales que el Control con valores de 6.0859 y 9.0709 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$, respectivamente. Los valores son estadísticamente superiores ($p\leq 0.05$) para los tratamientos Ethephon 2 mL/L y Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L con respecto a los tratamientos Control, OGA 5.0 g/L y OGA 2.5 g/L. Al día 1, la producción de etileno es de 6.22 para Ethephon 2 mL/L y para Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L es 5.14 veces superior al Control (5.5600 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$). En el tercer muestreo, disminuyeron los niveles de producción de etileno en todos los tratamientos sin presentar diferencias significativas en ellos. En el muestreo realizado 8 días después de la aplicación de los tratamientos, los tratamientos de OGAs 5.0 g/L (31.3110 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$) y Ethephon 2 mL/L (24.0622 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$), presentaron valores estadísticamente superiores al resto de los tratamientos, siendo 12.58 y 9.43 veces mayor que el Control (2.3051 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$), respectivamente. Para el día 11, el comportamiento de los discos tratados con OGA 2.5 g/L y Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L tuvieron un comportamiento similar al del tratamiento control ($p\geq 0.05$). A los 14 días después de la aplicación de tratamientos no se encontró ninguna diferencia significativa entre ellos.

La producción de etileno en frutos de tomate entero es de 0.25 nL/ g·h, a 20 °C y en discos de pericarpio de tomate es de 5 a 20 veces superior los niveles de etileno en fruto entero (Campbell *et al.*, 1990). Sin embargo, Suslow y Cantwell (2010), reportan niveles superiores de 4.3 a 4.9 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$ a 20 °C para fruto entero.

Cuadro 4. Producción de etileno ($\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$) en discos de frutos de tomate bola de la variedad 'Grandella' durante la maduración de los discos del fruto a partir del estado verde maduro, por efecto de una mezcla de OGAs de 3-20 GP, Ethepon, y su combinación.

Tratamientos	Días después de aplicación					
	0	1	4	8	11	14
Control	1.7490 ^a	5.5600 ^a	8.3830 ^a	2.3051 ^a	7.3480 ^{ab}	4.1862 ^a
OGA 5.0 g/L	1.7490 ^a	9.0703 ^a	6.8484 ^a	31.3110 ^c	6.0024 ^a	5.3764 ^a
OGA 2.5 g/L	1.7490 ^a	6.0859 ^a	5.5448 ^a	4.5565 ^a	8.1610 ^{ab}	2.6383 ^a
Ethepon 2 mL/L	1.7490 ^a	34.6125 ^b	11.6118 ^a	24.0622 ^{bc}	11.0961 ^b	5.3941 ^a
Ethepon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L	1.7490 ^a	28.5809 ^b	10.8859 ^a	9.2347 ^{ab}	7.6365 ^{ab}	8.7169 ^a

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Las letras similares por columna son estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

Estos datos son coincidentes con los obtenidos en esta investigación con 5.560 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$ para el Control en el día 1.

El etileno aplicado exógenamente estimula la biosíntesis de más etileno debido a su efecto autocatalítico, lo que da inicio a los procesos relacionados a la maduración temprana (Nair y Singh, 2003). Este efecto se observa al día 1 después de la aplicación de los tratamientos, donde la aplicación de Ethephon son significativamente diferentes al Control y otros tratamientos con OGAs ($p\leq 0.05$). Este efecto también se observa en el día 11 después de la aplicación de los tratamientos, donde los discos tratados con Ethephon mantienen una mayor producción de etileno en comparación con otros tratamientos, y donde además se observa que los discos tratados con OGA 5.0 g/L presentan la menor producción de etileno.

Se esperaba ver un efecto sinérgico en la aplicación del tratamiento de OGAs + Ethephon, ya que los OGAs inducen la producción de etileno en diversos frutos al igual que el Ethephon; sin embargo, este efecto no se dio. En un trabajo realizado por Choy *et al.* (1996) sugieren que este efecto inhibitorio se debe a que la inducción a la producción de etileno de los OGAs no es por la activación de la ACC sintasa.

En la Figura 4, se observa el efecto de AVG 10 mM para inhibir la síntesis de etileno a los 8 días de la aplicación de tratamientos reflejado en una drástica reducción de la producción de etileno. Además, se observa un contraste entre el efecto de los tratamientos con OGAs y Ethephon comparado con aminoetoxivinilglicina (AVG) 10 mM, un inhibidor de la síntesis de etileno. Se puede observar que los tratamientos Control, AVG 10 mM, AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L y AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L son estadísticamente iguales. En cambio, sí se encuentran diferencias estadísticas para OGA 5.0 g/L y Ethephon 2 mL/L con respecto al Control ($p\leq 0.05$) al día 8.

Los OGAs pueden actuar como inductores de etileno a partir de la aplicación de mezclas de OGAs de 1-12 GP (O'Donnell *et al.*, 1996; Campbell y Labavitch, 1991a,b; Simpson *et al.*, 1998). El tratamiento con OGA 5.0 g/L presentó una abrupta

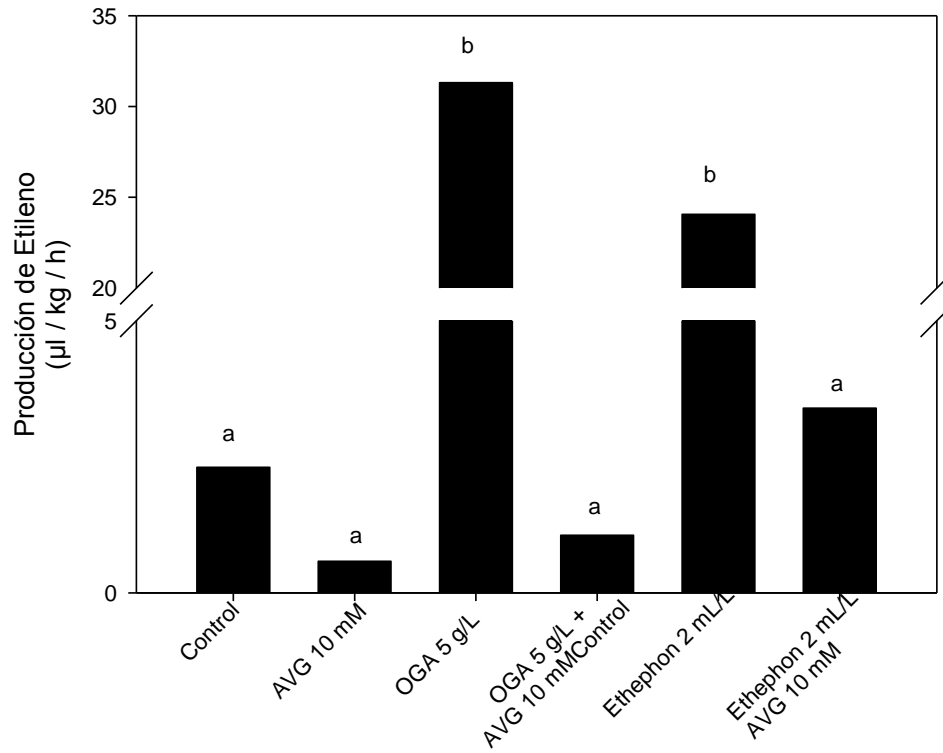


Figura 4. Producción de etileno ($\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$) en discos de pericarpio de tomate bola de la variedad 'Grandella' a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8 días después de la aplicación de AVG 10 mM, OGA 5.0 g/L; AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L; Ethephon 2 mL/L y AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L. Las letras similares son estadísticamente iguales entre barras con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

producción de etileno, lo cual coincide con la tendencia reportada por Campbell y Labavitch (1991a) en cultivos de células de pera tratados con una mezcla de 5 a 13 GP de OGAs obtenidos a partir de pectina de cítricos, confirmando que la aplicación de OGAs induce la producción de etileno. Esta alta producción de etileno se puede deber a los cambios que se inducen en el metabolismo como cambios de color, ablandamiento de pared celular, actividad enzimática, entre otros, cambios intrínsecos de la maduración del fruto de tomate como lo describen Alexander y Grierson (2002). La Figura 4 indica que el nivel de etileno en los discos tratados solo con AVG 10 mM (control negativo), confirmando la actividad elicitora de etileno por efecto de los OGAs en dosis de 5.0 g/L. Estudios de Choy *et al.*(1996) indican que al aplicar AVG más OGAs en presencia de Ca^{2+} se inhibe la producción de etileno inducida por los OGAs a diferencia del efecto de otro ión divalente como el Mg^{2+} .

Poco se ha reportado del efecto de los OGAs para inducir etileno varios días después de su aplicación, esto se debe a que se ha investigado la inducción de etileno principalmente en las primeras horas de aplicación del tratamiento con OGAs (Melotto *et al.*, 1994; Bretch y Huber, 1988; Campbell y Labavitch, 1991b). En el día 14, después de la aplicación de los tratamientos, no se presentaron diferencias significativas en los niveles de etileno entre los discos tratados con OGAs y Ethephon con respecto al control, lo que sugiere una estabilización en la producción de etileno.

Color

El cambio de color en la madurez del fruto se debe a los cambios en dos eventos principales: 1.- a la degradación de clorofila y 2.- a la acumulación progresiva de licopeno en el cloroplasto. En el Cuadro 5 Se puede observar que hay una tendencia a aumentar el índice de a^*/b^* . A mayor índice de a^*/b^* , se observa una clara relación con el aumento en el color rojo y disminución del amarillo. Los tratamientos no presentan diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre los tratamientos

con OGAs, Ethephon y su combinación al día 1. Esto indica que los discos se encuentran en un estado de color similar entre ellos. El valor negativo de la relación a^*/b^* indica que predomina mayormente el color verde (Batu, 2004; López-Camelo y Gómez, 2004).

El día 4 después de la aplicación de los tratamientos, se observan diferencias ($p \leq 0.05$) entre el control (-0.0234) respecto al los tratamientos con Ethephon 2 mL/L (0.2418) y Ethephon 2mL/L+ OGA 5.0 g/L (0.2776) que son 10.33 y 11.86 veces más que el Control. Los tratamientos con OGAs se mantienen estadísticamente iguales ($p \geq 0.05$) al control a pesar de que los primeros expresan una mayor tendencia al rojo que el control al día 4. En el Cuadro 6 observamos el efecto de los tratamientos con AVG 10 mM en la relación de color a^*/b^* . Los tratamientos con AVG 10 mM (-0.2477), AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L (-0.2120) son 9.58 y 8.05 veces menor que el control. Esto nos indica que los tratamientos a los cuales se les aplicó etileno dan lugar a la madurez temprana y que el AVG retrasa la madurez, los cambios de color así como la producción de etileno. Esto confirma la relación entre la maduración-color-etileno, las cuales ocurren simultáneamente.

En los días 8 y 11, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos de OGAs, Ethephon y Control ($p \geq 0.05$) manteniendo una relación de a^*/b^* muy similar entre ellas (Cuadro 5). Para el día 14, sólo los discos tratados con Ethephon alcanzaron una relación más alta mostrando una diferencia estadística contra el Control ($p \leq 0.05$). En una investigación realizada por Campbell y Labavitch (1991b), observaron un aumento en el parámetro a^* al aplicar ACC, un sustrato de la síntesis de etileno donde se presume que el enrojecimiento de estos discos se debió a los procesos de la síntesis de etileno.

Sin embargo, a los 8 días después de la aplicación de los tratamientos, para los discos tratados con AVG 10 mM (0.1559) y AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L (0.3046) sí mostraron un atraso en la degradación de clorofila y una disminución en la producción de etileno con respecto al Control ($p \leq 0.05$). Pero en los discos tratados

Cuadro 5. Evolución en el color en relación al valor a*/b* en discos de pericarpio de tomate bola cv. 'Grandella' al aplicar mezclas de OGA a 5.0 g/L y 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L, Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L.

Tratamientos	Días después de aplicación					
	0	1	4	8	11	14
Control	-0.4726 ^a	-0.3819 ^a	-0.0234 ^a	0.6580 ^a	0.7304 ^a	0.8678 ^a
OGA 5.0 g/L	-0.4726 ^a	-0.3662 ^a	0.0345 ^a	0.6723 ^a	0.7956 ^a	0.9176 ^{ab}
OGA 2.5 g/L	-0.4726 ^a	-0.3579 ^a	0.0190 ^a	0.6575 ^a	0.8900 ^a	0.8642 ^a
Ethephon 2 mL/L	-0.4726 ^a	-0.3544 ^a	0.2418 ^b	0.7519 ^a	0.8235 ^a	1.0286 ^b
Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L	-0.4726 ^a	-0.3464 ^a	0.2776 ^b	0.6889 ^a	0.7478 ^a	0.9439 ^{ab}

Cada valor es la media de 30 repeticiones. Las letras similares por columna son estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

Cuadro 6. Evolución en el color en relación al valor a*/b* en discos de pericarpio de tomate bola cv. 'Grandella' al aplicar AVG 10 mM, y combinaciones de AVG 10 mM+ Ethephon 2 mL/L, AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L.

Tratamientos	Días después de aplicación					
	0	1	4	8	11	14
Control	-0.4726 ^a	-0.3819 ^a	-0.0234 ^b	0.6580 ^b	0.7304 ^c	0.8678 ^b
AVG 10 mM	-0.4726 ^a	-0.4048 ^a	-0.2477 ^a	0.1559 ^a	0.4831 ^b	0.7074 ^a
AVG 10 Mm + OGA 5.0 g/L	-0.4726 ^a	-0.4006 ^a	-0.2120 ^a	0.3046 ^a	0.4226 ^a	0.6835 ^a
AVG 10 Mm + Ethephon 2 mL/L	-0.4726 ^a	-0.3771 ^a	0.1393 ^c	0.5315 ^b	0.6078 ^{bc}	0.7442 ^{ab}

Cada valor es la media de 30 repeticiones. Las letras similares por columna son estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

con AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L (0.5315) es muy similar al color desarrollado a los discos Control ($p \geq 0.05$) (Figura 6). Esto es coincidente con la producción de etileno en los discos tratados con AVG 10 mM+ Ethrel 2 mL/L, que también se refleja en la expresión de etileno (3.3921 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{h}$), manteniéndose relativamente constante hasta el final del experimento.

En contraste al día 11 después de la aplicación de los tratamientos, entre las aplicaciones de AVG, en el tratamiento control se observa la alta formación de color en comparación con los tratamientos con AVG (Cuadro 6), encontrándose diferencias significativas entre AVG 10 mM (0.4831) y AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L (0.4226) que son solo 0.66 y 0.57 veces el Control ($p \leq 0.05$) y donde AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L (0.6078) es estadísticamente igual al Control ($p \geq 0.05$). Para el día 14, la tendencia se repite, donde los valores de a^*/b^* se incrementaban con una consecuente formación de color rojo más intensa, la cual se debe a la acumulación de compuestos carotenoides y la pérdida de la clorofila en los cloroplasto (Fraser *et al.*, 1994; López-Camelo y Gómez, 2004). Entre los tratamientos control (0.84504), los de OGAs y Ethephon, sólo Ethephon 2 mL/L (1.0863) fue significativamente diferente al primero ($p \leq 0.05$); el valor de Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L (0.91943) fue estadísticamente similar al control y al de Ethephon.

En el trabajo realizado por Castañeda (2010) se observó que los OGAs y Ethephon actuaron de manera sinérgica permitiendo una coloración más intensa en uvas de mesa. Por esto, se esperaba una acción sinérgica en la formación de color al aplicar OGAs + Ethephon, pero la intensidad en los discos de tomate fue menor que en aquellos tratados con OGAs o Ethephon individualmente. Por lo que se piensa que los OGAs no inducen al color por el mismo camino que el etileno.

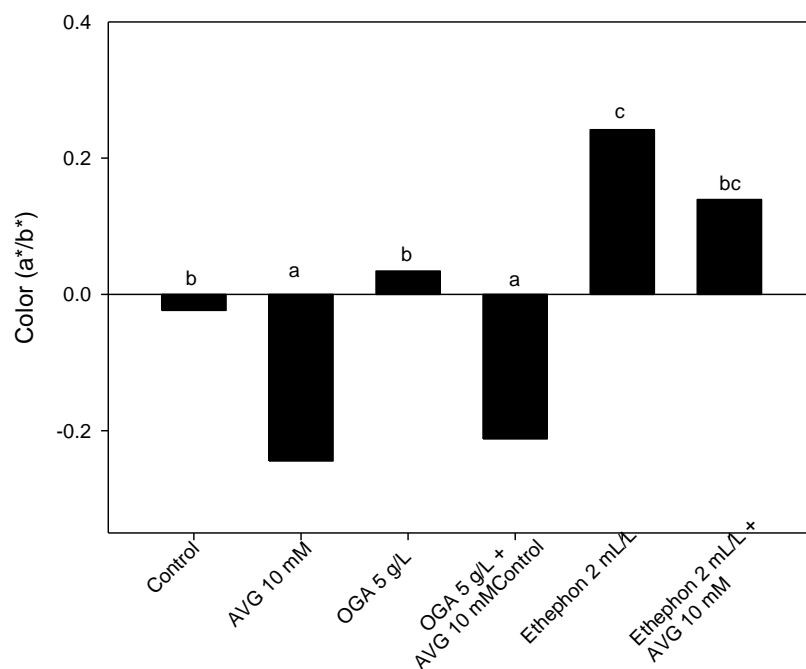


Figura 5. Cambios de color (a^*/b^*) en discos de pericarpio de tomate bola de la variedad 'Grandella' a 25 °C, 4 días después de la aplicación de AVG 10 mM, OGA 5.0 g/L; AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L; Ethephon 2 mL/L y AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L. Las letras similares son estadísticamente iguales entre barras con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

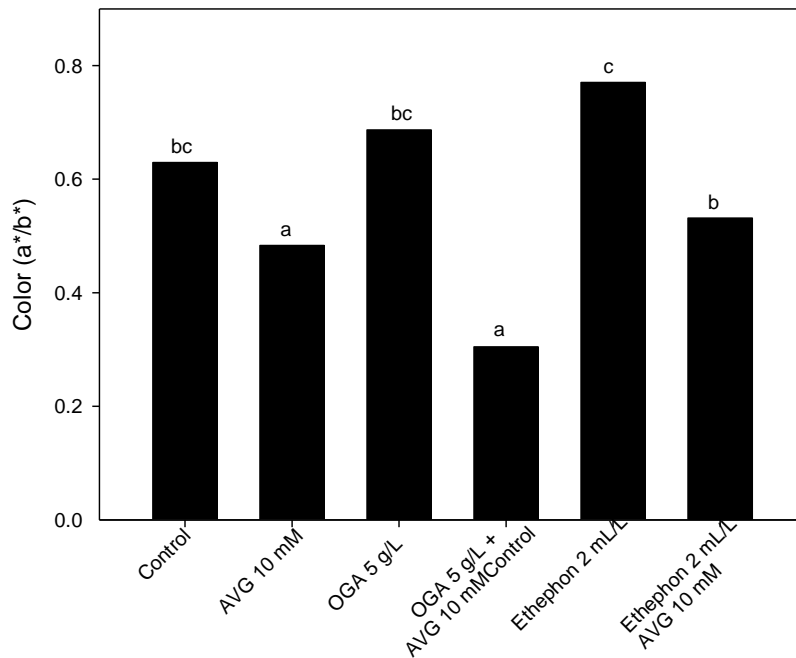


Figura 6. Cambios de color (a^*/b^*) en discos de pericarpio de tomate bola de la variedad 'Grandella' a 25 °C, 8 días después de la aplicación de AVG 10 mM, OGA 5.0 g/L; AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L; Ethephon 2 mL/L y AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L. Las letras similares son estadísticamente iguales entre barras con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

Cuantificación de Licopeno, β -Caroteno y Luteína en pericarpio de discos de tomate bola cv. 'Grandella'

En el Cuadro 7 se presentan los resultados de la acumulación de licopeno, β -caroteno y luteína, por la aplicación de los tratamientos de Ethephon y OGAs a los días 0, 8 y 14. Se puede observar que no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos para licopeno ($p \geq 0.05$). El mismo comportamiento se observó para los carotenoides β -caroteno y luteína respecto al comportamiento con OGAs y Ethephon. A pesar de no encontrarse diferencias estadísticas entre la acumulación de carotenoides por la aplicación de estos tratamientos en los discos de pericarpio de tomate ($p \geq 0.05$), se encontró que el tratamiento OGA 5.0 g/L (2.173 mg/ 100 g) estimuló la acumulación de licopeno 1.15 veces el Control, y 1.25 veces en Ethephon 2 mL/L (2.356 mg/100 g) al día 14. Para β -caroteno, sólo Ethephon 2 mL/L incrementó 1.98 veces el valor del Control. La luteína no se vio afectada por ninguno de los tratamientos de OGAs y Ethephon. Con esto, podemos deducir que la aplicación y estimulación con etileno, al promover la maduración del fruto, estimula la acumulación de carotenoides como el licopeno y el β -caroteno. En contraste, podemos observar que el tratamiento con AVG 10 mM inhibió la producción de carotenoides (Cuadro 8). Confirmando la relación de la producción de etileno con la síntesis de carotenoides.

Las cantidades de licopeno descritas en el Cuadro 7 son muy bajas en comparación a algunas referencias donde se acumulan de 45 $\mu\text{g/g}$ hasta 117 $\mu\text{g/g}$ de all- *trans*- licopeno (Aherne *et al.*, 2009; Lin y Chen, 2003; Toma *et al.*, 2008). Los datos obtenidos por los tratamientos de OGA 5.0 g/L y Ethephon 2 mL/L son comparables con datos encontrados por Toma *et al.* (2008) en tomates en diferentes etapas de madurez. Mounet *et al.* (2007), reportó una acumulación de licopeno de 2.08 mg/ 100 g en tomate de la variedad Ailsa Craig; datos que coinciden con los obtenidos en este trabajo. Aherne *et al.* (2009), reportaron cantidades de licopeno de 1.47 mg/100 g en tomate bola irlandés y 2.615 mg/100 g en tomate bola español. Estos valores son muy parecidos a los obtenidos en este trabajo.

Para β -caroteno tampoco se encontraron diferencias significativas para los tratamientos con OGAs y Ethephon ($p \geq 0.05$). En el tratamiento con AVG 10 mM se puede observar que no se afecta la formación de β -caroteno ya que es igual al contenido en el tratamiento control (1.294 mg/ 100 g), al día 8. Sin embargo, para el día 14, no se muestra diferencias significativas entre ningún tratamiento ($p \geq 0.05$). Para el día 14, se acumularon desde 1.175 a 2.331 mg/ 100 g de β -caroteno en los discos tratados con OGAs y Ethephon. Comparando con otras investigaciones, encontramos valores más bajos de 0.34 a 0.405 mg/100 g de β -caroteno en tomates bola enteros (Aherne *et al.*, 2009; Mounet *et al.*, 2007). Otros como Fraiser *et al.* (1994) reportó 2.53 mg/ 100 g de β -caroteno en tomate de la variedad Ailsa Craig. Este valor es muy similar a los que arrojó esta investigación.

Para luteína tampoco se encontraron diferencias ($p \geq 0.05$) entre los tratamientos valorados a los días 8 y 14 después de la aplicación de los tratamientos de OGAs y Ethephon (Cuadro 7). El control dio un valor de 3.233 mg/ 100 g de luteína. En la bibliografía, los valores reportados en tomates crudos de la variedad Ailsa Craig son de 0.21 a 0.38 los más altos encontrados (Mounet *et al.*, 2007; Fraser *et al.*, 1994). A pesar de las diferencias tan grandes en los datos arrojados por esta investigación en comparación de las referencias en luteína, no hubo diferencias estadísticas para la acumulación de luteína entre los tratamientos aplicados ($p \geq 0.05$).

No se encontraron referencias relacionadas a la acumulación de carotenoides por aplicación de Ethephon o de OGAs. Y por lo relacionado con los tratamientos de AVG en donde sí hubo acumulación de estos compuestos, podría sugerirse que la formación de carotenoides no es completamente dependiente de la presencia de etileno. En un estudio realizado por Alba *et al.* (2000) encontraron que la acumulación de licopeno es independiente de la producción de etileno y se debía más a la incidencia de luz roja. Parte de la falta de acumulación de los carotenoides puede deberse a que fue un trabajo realizado sin incidencia de luz; además, de que por ser en tejidos y no en frutos en planta, pudo haber falta de co-factores que ayuden a la señalización.

Cuadro 7. Acumulación de licopeno, β -caroteno y luteína en discos de pericarpio de tomate bola cv. 'Grandella' al aplicar mezclas de OGA a 5.0 g/L y 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L, Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L.

Tratamientos	Días después de aplicación								
	Licopeno (mg/100 g)			β -Caroteno (mg/100 g)			Luteína (mg/100 g)		
	0	8	14	0	8	14	0	8	14
Control	0.247 ^a	1.351 ^a	1.877 ^a	0.351 ^a	1.294 ^a	1.175 ^a	1.517 ^a	1.753 ^a	3.233 ^a
OGA 5.0 g/L	0.247 ^a	1.282 ^a	2.173 ^a	0.351 ^a	0.922 ^a	1.252 ^a	1.517 ^a	1.420 ^a	3.296 ^a
OGA 2.5 g/L	0.247 ^a	1.366 ^a	1.843 ^a	0.351 ^a	1.265 ^a	1.610 ^a	1.517 ^a	1.653 ^a	2.206 ^a
Ethephon 2 mL/L	0.247 ^a	1.598 ^a	2.356 ^a	0.351 ^a	0.998 ^a	2.331 ^a	1.517 ^a	1.922 ^a	2.461 ^a
Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L	0.247 ^a	1.376 ^a	1.704 ^a	0.351 ^a	1.481 ^a	1.481 ^a	1.517 ^a	1.482 ^a	2.322 ^a

Cada valor es la media de 2 repeticiones. Las letras similares por columna son estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

Cuadro 8. Acumulación de licopeno, β -caroteno y luteína en discos de pericarpio de tomate bola cv. 'Grandella' al aplicar AVG 10 mM, y combinaciones de AVG 10 mM+ Ethephon 2 mL/L, AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L

Tratamientos	Días después de aplicación								
	Licopeno (mg/100 g)			B-Caroteno (mg/100 g)			Luteína (mg/100 g)		
	0	8	14	0	8	14	0	8	14
Control	0.247 ^a	1.351 ^a	1.877 ^a	0.351 ^a	1.294 ^b	1.175 ^a	1.517 ^a	1.753 ^a	3.233 ^a
AVG 10 mM	0.247 ^a	0.871 ^a	1.317 ^a	0.351 ^a	1.270 ^b	1.369 ^a	1.517 ^a	1.289 ^a	1.251 ^a
AVG 10 Mm + OGA 5.0 g/L	0.247 ^a	0.629 ^a	1.582 ^a	0.351 ^a	0.908 ^a	1.530 ^a	1.517 ^a	1.145 ^a	2.017 ^a
AVG 10 Mm + Ethephon 2 mL/L	0.247 ^a	0.986 ^a	1.671 ^a	0.351 ^a	1.07 ^{ab}	1.042 ^a	1.517 ^a	1.430 ^a	2.009 ^a

Cada valor es la media de 2 repeticiones. Las letras similares son estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

Estudio Molecular

Evaluación de la Expresión de Genes de la Biosíntesis de Carotenoides en Discos de Pericarpio de Tomate Bola 'Grandella'.

Se evaluó de manera semicuantitativa los niveles de expresión de los ARN mensajeros que codifican para las enzimas fitoeno sintasa (*LePSY*) y ζ -caroteno desaturasa (*LeZDS*). Se utilizaron discos tratados con OGA 5.0 g/L, OGA 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L, Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L y control. Así como también se evaluaron discos con los tratamientos de AVG 10 mM y AVG 10mM + OGA 5.0 g/L y AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L. Los valores relativos se obtuvieron normalizando los niveles de expresión de los genes de interés con el del gen constitutivo 3-gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*LeGAPDH*).

Expresión de *LePSY*

Los resultados de la expresión del gen *LePSY* obtenido de los discos de pericarpio de tomate tratados con OGAs y Ethrel se observan en el Cuadro 9. Los niveles de expresión de los transcritos *LePSY* acumulados fueron más altos en los discos de los días 8 y 11 a los que se aplicaron los tratamientos OGA 5.0 g/L, OGA 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L y OGA 5.0 g/L + Ethephon 2mL/L que en los discos control.

La expresión de la *LePSY* es de las más estudiadas durante el desarrollo de frutos como tomate, albaricoque y frutos cítricos (Gioro *et al.*, 2007; Fraser *et al.*, 1994; Giuliano *et al.*, 1993; Marty *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2004) donde la PSY se expresa desde el inicio de la carotenogénesis. En el presente trabajo se encontró que al día uno después de la aplicación de tratamientos, se incrementó la expresión de *LePSY* por la aplicación de Ethephon 2 mL/L. En albaricoques, se observó que frutos tratados con etileno expresaron al gen que codifica para PSY (Marty *et al.*, 2005) lo cual inicia procesos de maduración en los discos de tomate. Por la

aplicación de los OGAs no se encontró diferencia significativa ($p \geq 0.05$) en comparación al Control, pero para Ethephon (17.4363) sí se encontró una alta inducción del gen *LePSY* expresándose 16.15 veces más que el Control ($p \leq 0.05$).

Al tercer muestreo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos para la expresión de *LePSY* ($p \geq 0.05$), siendo que en relación a la formación del color, inicia la etapa de maduración. Estos datos concuerdan con los encontrados en frutos de tomate (Gioro *et al.*, 2007) y albaricoque (Marty *et al.*, 2005) donde al comenzar los cambios de color incrementa la expresión de PSY. En un trabajo realizado por Giuliano *et al.* (1993) se reportó que de acuerdo al avance de la madurez del fruto de tomate, la expresión de la PSY va aumentando. En un estudio realizado por Giorio *et al.* (2007), se observó que al día 10 (estado rosado), la expresión de PSY estaba en su máxima expresión. En este estudio, 8 días después de la aplicación de los tratamientos, donde ya hay cambios considerables de color en los discos de tomate por acumulación de carotenoides, se observan incrementos en la expresión del transcrito de *LePSY* mostrando un comportamiento similar entre los tratamientos.

Al día 11, la expresión relativa de *LePSY* disminuyó para todos los tratamientos y sin presentar diferencias significativas entre ellos ($p \geq 0.05$). Al día 14 después de la aplicación de los tratamientos, la expresión de *LePSY* en los discos tratados con OGA 2.5 g/L y Ethephon 2 mL/L aumentó. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \geq 0.05$) a pesar de que la expresión de *LePSY* para el tratamiento OGA 2.5 g/L aumentó 6 veces la expresión del tratamiento Control.

De acuerdo a los resultados, el tratamiento de Ethephon 2 mL/L induce a una alta expresión del gen *LePSY* a las 24 h después de la aplicación; sin embargo, no se observa mayor acumulación de los carotenoides en los discos de tomate por acción de PSY entre tratamientos, por lo que puede decirse que esta enzima está inactiva.

Cuadro 9. Niveles de expresión del ARNm de *LePSY*, obtenidos de discos de pericarpio de tomate bola 'Grandella' al aplicar dos mezclas de OGA a 5.0 g/L y 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L, Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L.

Tratamientos	Días después de aplicación					
	0	1	4	8	11	14
Control	0.7613 ^a	1.0164 ^a	0.8177 ^a	3.2096 ^a	2.9204 ^a	0.5610 ^a
OGA 5.0 g/L	0.7613 ^a	1.3452 ^a	0.4748 ^a	2.2364 ^a	1.5207 ^a	1.1543 ^a
OGA 2.5 g/L	0.7613 ^a	1.1409 ^a	0.3946 ^a	2.2217 ^a	1.1396 ^a	3.9320 ^a
Ethrel 2 mL/L	0.7613 ^a	17.4363 ^b	0.4449 ^a	2.3754 ^a	1.4600 ^a	ND
Ethrel 2 mL/L + OGA 5.0 g/L	0.7613 ^a	1.5698 ^a	0.7693 ^a	2.0381 ^a	1.2296 ^a	0.8538 ^a

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Las letras similares son estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey. ND: No determinado.

Expresión de *LeZDS*

En el Cuadro 10 se observan los niveles de expresión de los transcritos del gen que codifica para la enzima ζ -caroteno desaturasa (*LeZDS*) acumulados en los discos de pericarpio de tomate tratados con OGA 5 g/L, OGA 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L y la combinación de Ethephon 2mL/L + OGA 5.0 g/L. Al día cero, cuando el estado de madurez es verde maduro, se detectaron transcritos del gen *LeZDS*. Al día uno después de la aplicación de tratamientos, la expresión del gen aumentó y mostró una mayor expresión en el tratamiento con Ethephon; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \geq 0.05$). Al día 4, la expresión de *LeZDS* alcanzó su nivel de expresión más alta para los tratamientos Control, OGA 2.5 g/L y Ethephon (2.3056, 2.3419 y 2.3354, respectivamente). En este tercer muestreo, los tratamientos con OGA 5.0 g/L y Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L fueron estadísticamente diferentes al Control ($p \leq 0.05$). A los 8 días después de la aplicación de los tratamientos, se observa una disminución de la expresión del gen *LeZDS* para todos los tratamientos sin diferencias estadísticas entre ningún tratamiento. Para el día 11 después de la aplicación de los tratamientos, la expresión se vio disminuida para todos los tratamientos sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Al día 14 el comportamiento fue similar al día 11, donde también se observó disminución de la expresión de la *LeZDS* para el Control de 1.1535 a 0.3155. Pero para los tratamientos de OGA 2.5 g/L y Ethephon 2 mL/L, la expresión relativa era más alta de 4.64 y 5.04 veces el Control, respectivamente no mostrando diferencias estadísticas ($p \geq 0.05$).

Cuadro 10. Niveles de expresión del ARNm de *LeZDS*, obtenidos de discos de pericarpio de tomate bola 'Grandella' al aplicar dos mezclas de OGA a 5.0 g/L y 2.5 g/L, Ethephon 2 mL/L, Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L.

Tratamientos	Días después de aplicación					
	0	1	4	8	11	14
Control	0.7401 ^a	1.2636 ^a	2.3056 ^c	1.3795 ^a	1.1535 ^a	0.3155 ^a
OGA 5.0 g/L	0.7401 ^a	1.3404 ^a	0.4801 ^a	1.1830 ^a	0.9990 ^a	0.5965 ^a
OGA 2.5 g/L	0.7401 ^a	1.4191 ^a	2.3419 ^c	1.1942 ^a	1.2051 ^a	1.4661 ^a
Ethephon 2 mL/L	0.7401 ^a	2.0162 ^a	2.3354 ^c	1.0005 ^a	0.7729 ^a	1.5919 ^a
Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L	0.7401 ^a	1.5452 ^a	1.6060 ^b	0.9239 ^a	1.4038 ^a	0.8525 ^a

Cada valor es la media de 3 repeticiones. Las letras similares son estadísticamente iguales con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

Para enfatizar los niveles de expresión al día 4, donde se encontraron diferencias ($p \leq 0.05$) se esquematiza la Figura 7, donde se observa que la expresión de la *LeZDS* fue menor en los discos tratados con AVG 10 mM y AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L que en los discos Control y los tratados con AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L (3.1221). Este aumento en la expresión dado por AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L indica que el etileno induce la expresión de *LeZDS*; sin embargo, en trabajos realizados en ausencia de etileno o poco etileno, se ha visto que la regulación de *LeZDS* es independiente de etileno (Alba *et al.*, 2000).

Giorio *et al.* (2007) encuentra que la transcripción de la ZDS se dispara en la etapa quebrante (4 días después del estado verde maduro, donde inician los primeros cambios de color) y continúa aumentando hasta la etapa rojo intenso. En este trabajo se observó que al día 4 los niveles del transcrito de *LeZDS* en discos Control y tratados con OGA 2.5 g/L y Ethephon 2 mL/L aumentaron su expresión durante el experimental. Los siguientes días fue decayendo. Esto podría indicar que la síntesis de etileno producida por los tratamientos de OGAs y Ethephon acelera la expresión de la ZDS pero el mismo comportamiento se observó para el Control. Para OGA 5.0 g/L y Ethephon 2 mL/L + OGA 5.0 g/L se observó que la expresión fue más baja. Esto puede deberse a que los OGAs intervienen en otros caminos de señalización para producir etileno. En la investigación realizada por Choy *et al.* (2002), quienes trataron hipocótilos de frijol mongo con AVG para observar el efecto de los OGAs (>7 GP) en la síntesis de etileno, observaron una ligera producción de etileno en los hipocótilos tratados con AVG y Co^{2+} y/o Mg^{2+} con OGAs. Pero los que

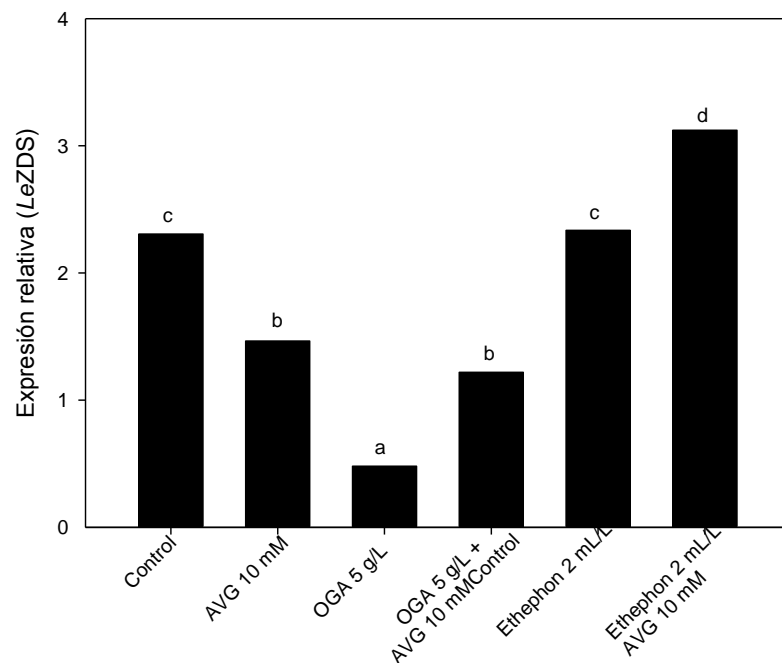


Figura 7. Niveles de expresión del transcrito de *LeZDS* en discos de pericarpio de tomate bola de la variedad ‘Grandella’ a 25 °C, 4 días después de la aplicación de AVG 10 mM, OGA 5.0 g/L; AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L; Ethephon 2 mL/L y AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L. Las letras similares son estadísticamente iguales entre barras con un nivel de confianza del 95% por la prueba de Tukey.

tenían AVG más el catión Ca^{2+} y OGAs, no produjeron etileno pudiendo adoptar otro camino para la producción de etileno. En este trabajo observamos que los discos con OGA 5.0 g/L indujeron 0.20 veces el Control a la expresión de *LeZDS* que los demás tratamientos de la Figura 7. El tratamiento AVG 10 mM + OGA 5.0 g/L tuvo una expresión estadísticamente igual ($p \geq 0.05$) a la de sólo AVG. Esto nos dice que la *LeZDS* se expresa por la acción del AVG, pero los OGAs inducen muy ligeramente la expresión de este gen; sin embargo, la expresión del transcrito de la *LeZDS* por AVG no significa que la enzima esté activa y dé lugar a la biosíntesis de carotenoides, como es en este caso, ya que el color en los tratamientos de AVG y AVG con OGA fueron menores que los de OGAs al día 8. Esto es, que los OGAs activan a esta enzima pudiendo ser afectada por la concentración o por el GP de los mismos. La expresión de *LeZDS* en los discos Control fue estadísticamente similar a los tratados con Ethephon 2 mL/L, mientras que los tratados con AVG 10 mM + Ethephon 2 mL/L alcanzaron un nivel mayor del transcrito, significativamente distinto al control ($p \leq 0.05$), sin embargo, como se dijo anteriormente, la actividad sinérgica que ofrece el AVG con Ethephon en la expresión del gen, no implica que la enzima esté activa.

CONCLUSIONES

La aplicación de oligogalacturónidos en dosis de 2.5 y 5.0 g/L a discos de pericarpio de tomate cv. 'Grandella' no inducen incrementos en la expresión de los genes de *LePSY* y *LeZDS* durante la maduración de los discos de pericarpio de tomate. De la misma forma, la acumulación de licopeno, β -caroteno y luteína no se ve afectada por la aplicación de los OGAs en un período de 14 días.

La aplicación de 5.0 g/L de oligogalacturónidos inducen incrementos en la velocidad de respiración y la producción de etileno en discos de tomate cv. 'Grandella'.

La aplicación de Ethephon 2 mL/L, induce un incremento significativo en la expresión del gen *LePSY* a las 24 horas, lo que favorece la inducción a la maduración y formación de color en el fruto de tomate.

REFERENCIAS

- Aherne, S.A., Jiwan, M.A., Daly, T., O'Brien, N.M.** (2009) Geographical location has greater impact on carotenoid content and bioaccessibility from tomatoes than variety. *Plant Foods For Human Nutrition*. **64**: 250-256
- Alba, R., Cordonnier-Pratt, M., Pratt, L.H** (2000) Fruit-localized Phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiology* **123**: 363-370
- Alexander, L. y Grierson, D.** (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 2039-2055
- Auldriche, M.E., McCarty, D.E., Klee, H.J.** (2006) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology*. **6**: 315-321
- Aziz, A., Heyraud, A., Lambert, B.** (2004) Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*. **218**: 767- 774
- Balandrán, Q.R.** (2003) Función de la pared celular en el desarrollo del daño por frío en frutos de calabaza zucchini (*Cucurbita pepo* L.): las oligosacarinas como medidoras de la respuesta a las bajas temperaturas. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, México.
- Báez Sañudo, M., Siller, J., Muy, D., Araiza, E., Contreras, L., Sañudo, A.** (2001) Smartfresh™: Una novedosa tecnología para extender vida de anaquel en tomate. *Tecnología de Alimentos*. XXXII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Barry, C. S. y Giovannoni, J.J.** (2006) Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**: 7923-7928
- Blankenship, S.M. y Dole, J.M.** (2003) 1-Methylciclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*. **28**: 1-25

- Beyer, E. M.** (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology*. **58**: 268-271
- Bojórquez, F** (2007) Estrategias de producción. Los cambios constantes impulsan la necesidad de mejorar las estructuras productivas. *Hortalizas.com*. Consultada en Abril, 2009.
- Botella, P.P., Besumbes, O., Phillips, M.A., Carreto, P.L., Boronat, A., Rodríguez, C.M.** (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal*. **40**: 188-199
- Bramley, P.** (2002) Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 2107-2113
- Cabrera, J.C., Boland, A., Messiaen, J., Cambier, P., Van Cutsem, P.** (2008) Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology*. **18** (6): 473-482
- Campbell, A.D y Labavitch, J.M.** (1991a) Induction and regulation of ethylene biosynthesis by pectic oligomers in cultured pear cells. *Plant Physiology*. **97**: 699-705
- Campbell, A.D y Labavitch, J.M.** (1991b) Induction and regulation of ethylene biosynthesis and ripening by pectic oligomers in tomato pericarp discs. *Plant Physiology*. **97**: 706-713
- Campbell, A.D., Huysamer, M., Stotz, H.U., Greve, C., Labavitch, J.M.** (1990) Comparison of ripening processes in intact tomato fruit and excised pericarp discs. *Plant Physiology*. **94**: 1582-1589
- Cancel, J.D. y Larsen, P.B.** (2002) Loss-of-function mutations in the ethylene receptor *ETR1* cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **129**: 1-11
- Castañeda, V. B.** (2010) Inducción de antocianinas y capacidad antioxidante por oligogalacturónidos en uvas de mesa cv. 'Flame Seedless'. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, México.
- Calvo, G. (2000)** Control de la escaldadura superficial mediante la aplicación de 1-MCP en manzanas cv. Granny Smith. 20 p. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Establecimiento Educativo Argentino Alto Valle, Argentina.

- Choy, Y.H., Lee D.H., Lee, J.S.** (1996) The effect of oligosaccharides on ethylene production in mung bean (*Vigna radiate* W.) hypocotyl segments. *Journal of Pplant Biology*. **39**(4): 295-300.
- Darvill, A. G., Albersheim, P.** 1992. Oligosaccharins: Oligosaccharides regulatory molecules. *Acc. Chem. Res.* **25**: 77-83.
- Darvill, A., Augur, C., Bergmann, C., Carlson, R.W., Cheong, J.J., Eberhard, S., Hahn, M.G., Ló, V.M., Marfà, V., Meyer, B., Mohnen, D., O'Neill, M.A., Spiro, M.D., van Halbeek, H., York, W.S., Albersheim, P.** (1992) Oligosaccharins-oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology*. **2**(3): 181-198
- Díaz, J., ten Have, A., Van Kan, J.A.** (2002) the role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*. **129**: 1341-1351
- Enriquez-Guevara, E.A., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M.A.** (2010) Oligosacarininas derivadas de pared celular: actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. **28**(2): 144-155
- Fraser, P.D., Romer, S., Kiano, J.W., Shipton, C.A., Mills, M.B., Drake, R., Schuch, W., Bramley, P.M.** (2001) Elevation of carotenoids in tomato by genetic manipulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **81**: 822-827
- Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W., Bramley, P.M.** (1994) Carotenoid Biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiology*. **105**: 405-413
- Gautier, H., Djakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., Poëssel, J.L., Caris-Veyrat, C., Génard, M.** (2008) How does tomato quality (Sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **56**: 1241-1250
- Gao, H., Zhu, H., Shao, Y., Chen, A., Lu, C., Zhu, B., Luo, Y.** (2008). Lycopene accumulation affects the biosynthesis of some carotenoid-related volatiles independent of ethylene in tomato. *Journal of Integrative Plant Biology*. **50** (8): 991-996
- GenBank** (2009) Base de datos para secuencias genéticas del National Institute of Health, USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/6470254?report=genbank>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/170415?report=genbank>. Consultada en Abril, 2009.

- Gioro G., Stigliani, A.L., D'Ambrosio, C.** (2007) Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic High Caro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic Research* **16**: 15-28
- Gould, W.A.** (1983) *Tomato production, processing and technology*, 2a. edn. CTI Publications. Baltimore, pp. 63-64
- Hernández, M., Rodríguez, E., Díaz, C.** (2007) Free hydroxycinnamic acids, lycopene, and color parameters in tomato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55** (21): 8604-8615
- Hoeberichts, F.A., Van Der Plas, L.H., Woltering, E.J.** (2002) Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associates physiological changes even at advanced stages of ripening. *Postharvest Biology and Technology*. **26**: 125-133
- INDIAAGRONET** (2000) Tomato exhibition. <http://www.indiaagronet.com/tomato/resources/2/2center.htm>. Consultada en Abril de 2009.
- Kader, A.A. y Saltveit, M.E.** (2003) Respiration exchange *en* *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. 2a. edn. Editores: J. Bartz y J. Brecht. Editorial Marcel Dekker, Estados Unidos, pp. 7-29
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H., Yano, M.** (2004) Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology*. **134**: 824-837
- Klee, H.J.** (2002) Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 2057-2063
- Lelièvre, J.M., Latché, A., Jones, B., Bouzayen, M., Pech, J.C.** (1997) Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*. **101**(4): 727-739
- Liu, h., Jiang, W., Zhou, L., Wang, B, Luo, Y.** (2005) The effects of 1-methylcyclopropene on peach fruit (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) ripening and disease resistance. *International Journal of Food Science and Technology*. **40**: 1-7
- Locke J. M., Bryce J. H. y Morris, P. C.** (2000) Contrasting effects of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany*. **58**: 1843- 1849
- López C.A. y Gómez, P.A.** (2004) Comparison of color indexes for tomato ripening. *Horticultura Brasileira*. **22**: 534-537

- Lin, C.H. y Chen, B.H.** (2003) Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. **1012**: 103-109
- Manrique, E.** (2003) Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz. *Ecosistemas* (URL: <http://www.aeet.org/ecosistemas/031/informe4.htm>)
- Marfà, V., Gollin, D.J., Eberhard, S., Mohnen, D., Darvill, A., Albersheim, P.** (1991) Oligogalacturonides are able to induce flowers to form on tobacco explants. *Plant Journal*. **1**(2): 217-225
- Marty, I., Bureau, S., Sarkissian, G., Gouble, B., Audergon, J.M., Albagnac, G.** (2005) Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in colour-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). *Journal of Experimental Botany*. **56**: 1877-1886
- Mortain, B.A. Stammitti, L., Telef, N., Colardelle, P., Brouquisse, R., Rolin, D., Gallusci, P.** (2008) Effects of exogenous glucose on carotenoid accumulation in tomato leaves. *Physiologia Plantarum*. **134**: 246–256
- Mounet, F., Lemaire-Chamley, M., Maucourt, M., Cabasson, C., Giraudel, J., Deborde, C., Lessire, R., Gallusci, P., Bertrand, A., Gaudillère, M., Rothan, C., Rolin, D., Moing, A.** (2007) Quantitative metabolic profiles of tomato flesh and seeds during fruit development: complementary analysis with ANN and PCA. *Metabolics*. **3**: 273-288
- Mounet, F., Moing, A., Garcia, V., Petit, J., Maucourt, M., Deborde, C. Bernillon, S., Le Gall, G., Colquhoun, I., Defernez, M., Giraudel, J.L. Rolin, D., Rothan, C., Lemaire, C.M.** (2009). Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. *Plant Physiology*. **149**: 1505-1528
- Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K.K.** (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*. **125**: 1558-1566
- Nair, S. y Singh, Z.** (2003) Pre-storage ethrel dip reduces chilling injury, enhances respiration rate, ethylene production and improves fruit quality of 'Kensington' mango. *International Journal of Food, Agriculture & Environment*. **1**: 93-97
- NORMEX** (2007) Organismo de certificación en calidad, sanidad e inocuidad de agroproductos. <http://www.normich.com.mx>. Consultada en Mayo de 2009.
- Ochoa, M.V.** (2008) Efecto de la aplicación de oligogalacturónidos en la inducción de color y síntesis de antocianinas en uvas de mesa roja. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, México.

- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O., Bowles, D.J.** (1996) Ethylene as a signal mediating the wound the response of tomato plants. *Science*. **274**: 1914-1917
- Oliva, L.A., Zapata, L.M., Gerard, L.M., Davies, C.V.** (2006) Variación del color durante el crecimiento, almacenamiento, maduración y comercialización del tomate. Universidad Nacional de Entre Ríos. Concepción del Uruguay, Argentina.
- Osborne, D.J. y McManus, M.** (2005) Hormones and signals: identification and description of signaling molecules. En *Hormones, signals and target cells in plant development*. Editor: J Bard, Ed. Cambridge University Press, Reino Unido, pp. 6-41
- Osorio, S., Castillejo, C., Quesada, M.A., Medina-Escobar, N., Brownsey, G., J., Suau, R., Heredia, A., Botella, M.A., Valpuesta, V.** (2008) Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry. *The Plant Journal*. **54**: 43-55
- Ornelas-Paz, J.J., Yahia, E.M., Gardea, A.A.** (2008) Changes in external and internal color during postharvest ripening of 'Manila' and 'Ataulfo' mango fruit and relationships with carotenoid content determined by liquid chromatography- APcl+- time-of-flight mass spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*. **50**: 145-152
- Pizarro, L., y Stange, C.** (2009) Light dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Revista Ciencia e Investigación Agraria*. **36**(2):143-162
- Ribas-Carbó, m., Flórez-Sarasa, D., González-Meller, M.A.** (2008) La respiración de las plantas. En *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2ª. edn. Editores J Azcón-Bieto, y M Talón. Editorial Mac Graw Hill Interamericana, España, pp. 265-286
- Rodríguez-Concepción, M., Ahumada, I., Diez, JE, Sauret, G.S., Lois, L.M., Gallego, F., Carretero, P.L., Campos, N., Boronat, A.** (2001) 1-Deoxy-D-xylulose 5 -phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesys during tomato fruit ripening. *The Plant Journal*. **27**(3): 213-222
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D., Hirschberg, J.** (1999) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *The Plant Journal*. **17**(4), 341-351
- Rosales, M. A.; Ruiz, J.M.; Hernández, J.; Soriano, T.; Castilla, N.; Romero, L.**(2006) Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato

exocarp in relation to temperature and solar radiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **86**: 1545-1551

Ruiz, J., Terry, E., Tejada, T., Díaz, M.M. (2009) Aplicación de bioproductos a la producción ecológica de tomate. *Cultivos Tropicales*. **30**(3): 60-64

Ryan, C.A. (2000) The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**: 112-121

Saltveit, M.E. (1999). Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. **15**: 279-292

Salveit, M.E. (2005) Aminoethoxyvinylglycine (AVG) reduces ethylene and protein biosynthesis in excised discs of mature-green tomato pericarp tissue. *Postharvest Biology and Technology*. **35**: 183-190

Satoh, S. 1998 Functions of the cell wall in the interactions of plant cells: Analysis using carrot cultured cells. *Plant Cell Physiol*. **39** (4): 361-368.

SEFOA (2006). Secretaría de fomento agropecuario. <http://www.tlaxcala.gob.mx/sefoa/index.html>. Consultada en Mayo de 2009.

Shewfelt, R.L. (2003). Color. En *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. 2a. edn. Editores: J. Bartz y J. Brecht. Editorial Marcel Dekker, Estados Unidos, 287-295

SIAP (2008) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx>. Consultada en Marzo de 2009.

Simpson, S.D., Ashford, D.A., Harvey, D.J., Bowles, D.J. (1998) Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants. *Glycobiology*. **8** (6): 579-583

Sisler, E.C., Blankenship, S.M. (1996). Methods of counteracting an ethylene response in plants. Estados Unidos. Número de Patente 5,518,998.

Soares, C.A. and Mello, F.P. (2006) Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology*. **29**: 508-515

Spiro, M.D., Ridley, B.L., Eberhard, S., Kates, K.A., Mathieu, Y., O'Neill, M.A., Mohnen, D., Guern, J., Darvill, A., Albersheim, P. (1998) biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. **116**: 1289-1298

- Spiro, M.D., Kates, K.A., Koller, A.L., O'Neil, M.A., J., Darvill, A., Albersheim, P.** (1993) Purification and characterization of biologically active 1,4-linked α -D-oligogalacturonides after partial digestion of polygalacturonic acid with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research*. **247**: 9-20
- Suslow, T.V. y Cantwell, M.** (2002). *Postharvest Biology and Technology*. <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/Tomate.shtml>. Consultada en Marzo de 2009.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., Omiya, A.** (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*. **54**: 733-749
- Télef, N., Stammitti-Bert, L., Mortain-Bertrand, A., Maucourt, M., Carde, J.P., Rolin, D., Gallusci, P.** (2006) Sucrose deficiency delays lycopene accumulation in tomato fruit pericarp discs. *Plant Molecular Biology*. **62**: 453-469
- Toma, R.B., Frank, G.C., Nakayama, K., Tawfik, E.** (2008) Lycopene content in raw tomato varieties and tomato products. *Journal of Food Service*. **19**: 127-132
- Torres, G.G.** (2005) Inducción de respuesta de defensa en plantas de tabaco y vid mediante la aplicación de oligogalacturonidos. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, México.
- Wang, K.L., Li, H., Ecker, J.R.** (2002) Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*. S133-S155
- Watkins, C.B.** (2006) The use of 1-methylciclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*. **24**: 389-409
- Wills, R.B. y Ku, V.V.** (2002) Use of 1-MCP to extend the time to ripen of green tomatoes and postharvest life of ripe tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*. **26**: 85-90
- Weimer, M.R., Balke, N.E., Buhler, D.D.** (1992) Herbicide clomazone does not inhibit in vitro geranylgeranyl synthesis from mevalonate. *Plant Physiology*. **98**: 427-432
- Yang, S.F.** (1980) Biosynthesis and action of ethylene. *Horticultural Science*. **20**: 41-45
- Yu, Y.B., Adams, D.O., Yang, S.F.** (1980) Inhibition of ethylene production by 2,4-dinitrophenol and high temperature. *Plant Physiology*. **66**: 286-290
- Zapata, L.M., Gerard, L., Davies, C., Schvab, M.C.** (2007a). Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. *Ciencia, Docencia y Tecnología* **35**: 173- 193

Zapata, L.M., Gerard, L., Davies, C., Schwab, M.C. (2007b). Correlación matemática de índices de color del tomate con parámetros texturales y concentración de carotenoides. *Ciencia, Docencia y Tecnología* **34**: 207- 226